

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOLIPOSSOMA COM DUPLO
DIRECIONAMENTO ATIVO PARA O TRATAMENTO DE TUMORES CEREBRAIS

CRISTINA CORREIA COSTA RITA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor António José de Freitas Duarte

VOGAIS:

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Doutor Frederico Nuno Castanheira Aires da Silva

ORIENTADOR

Doutor Frederico Nuno

Castanheira Aires da Silva

CO-ORIENTADOR

Doutora Solange Judite

Roque Coelho Alves Gil Neves



Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

O trabalho apresentado nesta dissertação obteve suporte financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) (PTDC/BBB-BIO/0508/2014).

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOLIPOSSOMA COM DUPLO
DIRECIONAMENTO ATIVO PARA O TRATAMENTO DE TUMORES CEREBRAIS

CRISTINA CORREIA COSTA RITA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor António José de Freitas Duarte

VOGAIS:

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Doutor Frederico Nuno Castanheira Aires da Silva

ORIENTADOR

Doutor Frederico Nuno

Castanheira Aires da Silva

CO-ORIENTADOR

Doutora Solange Judite

Roque Coelho Alves Gil Neves

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Cristina Correia Costa Rita

Título da Dissertação: Contribuição para o desenvolvimento de um imunolipossoma com duplo direcionamento ativo para o tratamento de tumores cerebrais.

Ano de conclusão: 2020

Área científica: Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATORIO)

autorizo o acesso mundial*:

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 16 de Junho de 2020

Assinatura: Cristina Correia Costa Rita

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à Universidade de Lisboa, em particular à Faculdade de Medicina Veterinária, casa que me acolheu durante a maior parte do meu percurso académico, que me deu a oportunidade de aprender com excelentes profissionais e professores, proporcionando-me imensos momentos práticos para aperfeiçoar inúmeras técnicas. À Universidade dos Açores – Pólo de Angra do Heroísmo, por ter sido a minha primeira casa, onde realizei os preparatórios do MIMV, que me recebeu nos meus primeiros momentos longe de casa com imenso carinho.

Ao meu orientador, Doutor Frederico Aires da Silva, por todo o apoio e disponibilidade demonstrada tanto na escrita desta dissertação como ao longo do meu estágio laboratorial, sempre com imensa simpatia e paciência no esclarecimento de dúvidas e delineamento de trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Solange Gil, pela sua infinita simpatia, paciência e preocupação sempre demonstrada, tanto na unidade de isolamento como na escrita desta dissertação. Obrigado por toda a confiança, transmissão de conhecimentos e exemplo de profissionalismo.

À Dra. Inês Machado, pela confiança depositada em mim e por todos os momentos tanto de aprendizagem como de descontração, deu-me a oportunidade de aprender imenso num ambiente confortável e de incondicional apoio, característico na UIDI.

À minha tutora, Doutora Joana Dias, que me transmitiu os seus conhecimentos laboratoriais com a maior paciência do mundo e que estava presente diariamente com uma palavra de conforto quando as coisas não corriam bem à primeira. À Doutora Sandra Aguiar por toda a transmissão de conhecimentos e apoio na busca de informação. Obrigado a ambas pela persistência e resiliência demonstrada, sempre com imensa simpatia.

Às minhas colegas do estágio na UIDI pelo companheirismo e bom ambiente de troca de aprendizagem. Às minhas colegas do estágio laboratorial: Ana, Diana, Marta e Isa, por me terem transmitido os seus conhecimentos e me terem explicado todas as técnicas e esclarecido imensas dúvidas. Obrigado por todo o apoio.

Ao professor Telmo Nunes, pela ajuda na análise estatística.

À FCT que financiou este projeto no qual tive a oportunidade de participar.

Aos meus colegas e amigos que me acompanharam neste longo percurso académico, por todo o apoio nas épocas de exames e todos os momentos partilhados. Muito obrigado por estarem sempre presentes!

Aos meus amigos de infância, que acompanharam este meu percurso de perto, sempre com uma palavra de apoio e de consideração, lembrando-me sempre o verdadeiro valor de uma amizade.

Por último, mas mais importante, à minha família, que me fez ser a pessoa que sou hoje, que me fez persistir nos dias difíceis, que sempre esteve presente nos dias mais felizes, que me lembrava sempre que este era o meu sonho desde criança e que nunca deixou de acreditar em mim.

*“Success isn’t about the end result,
it’s about what you learn along the way”*

Vera Wang

CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOLIPOSSOMA COM DUPLO DIRECIONAMENTO ATIVO PARA O TRATAMENTO DE TUMORES CEREBRAIS

RESUMO

Na área da oncologia salientam-se semelhanças fisiopatológicas entre humanos e animais. A terapêutica nos tumores cerebrais representa um grande desafio, visto que, estes são caracterizados por um crescimento rápido e invasivo e os fármacos anti-neoplásicos apresentam grande dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica (BBB). Assim sendo, é imperativo o desenvolvimento de novos sistemas de fármacos que ultrapassem estas limitações. Após a descoberta da estrutura das células neoplásicas e da BBB, as nanopartículas como lipossomas e as moléculas de direcionamento têm demonstrado um grande potencial na modulação da disponibilidade dos fármacos utilizando mecanismos fisiológicos. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de um imunolipossoma com duplo direcionamento ativo para o tratamento de tumores cerebrais. Para tal, foi testada a expressão do folato e os efeitos citotóxicos do panobinostat (iHDAC) em linhas de tumores cerebrais primárias (U87) e secundárias (MCF7), tendo sido comparado com a atividade de lipossomas encapsulados com panobinostat e/ou acoplados a folatos. Adicionalmente, foram desenvolvidos e testados, num modelo da BBB *in vitro*, imunolipossomas em fusão com anticorpos de domínio único (FC5 e G3) com a capacidade de atravessar a BBB. Por fim, foi proposto o modelo *in vitro* da BBB + U87, testando os imunolipossomas com duplo direcionamento para a BBB e para as células neoplásicas.

Foram realizados dois ensaios independentes para cada fármaco e linha celular e em duplicado para cada concentração. A viabilidade celular foi avaliada através do reagente WST-1 e os valores de IC₅₀ calculados através do programa GraphPad Prism 8. Para análise estatística realizou-se uma ANOVA e o teste de Tukey, utilizando o programa R.

Os resultados obtidos sugerem que o panobinostat apresenta um efeito citotóxico nas linhas celulares U87 e MCF7. As formulações lipossomais com vectorização ativa apresentam efeito citotóxico semelhante à formulação livre. Além disso, o panobinostat não apresenta efeitos citotóxicos na linha celular da BBB. Com base nos resultados obtidos no ensaio da BBB *in vitro*, supõe-se que o anticorpo G3 (29,29%) seja mais eficaz na passagem através da BBB comparativamente ao FC5 (11,62%). No ensaio do modelo BBB + U87 ocorreu diminuição da integridade da barreira, porém observou-se efeito citotóxico na linha U87. Serão necessárias otimizações do novo modelo, estudos pré-clínicos e translacionais para determinar a utilidade clínica e a segurança do panobinostat lipossomal

Palavras-chave: BBB, imunolipossoma, nanomedicina, panobinostat, tumor cerebral

CONTRIBUTION TO THE DEVELOPMENT OF AN IMMUNOLIPOSOME WITH DUAL-TARGETING FOR THE TREATMENT OF BRAIN TUMORS

ABSTRACT

In oncology field, there are physiopathological similarities between humans and animals. Therapy in brain tumors represents a major challenge, since they are characterized by rapid and invasive growth and the antineoplastic drugs have great difficulty in crossing the blood-brain barrier (BBB). Therefore, it is imperative to develop new drug systems that overcome these limitations. After discovering the structure of neoplastic cells and BBB, nanoparticles such as liposomes and targeting molecules have shown great potential in the modulation of drug availability using physiological mechanisms. Thus, the present study aimed to contribute to the development of an immunoliposome with double active targeting for the treatment of brain tumors. For this purpose, folate expression and the cytotoxic effects of panobinostat (iHDAC) in primary (U87) and secondary (MCF7) brain tumor lines were tested, having been compared with the activity of liposomes encapsulated with panobinostat and/or coupled to folates. In addition, immunoliposomes fused with single domain antibodies (FC5 and G3) with the ability to cross the BBB were developed and tested in a BBB model in vitro. Finally, the in vitro model of BBB + U87 was proposed, testing immunoliposomes with double targeting for BBB and neoplastic cells.

Two independent assays were performed for each drug and cell line and in duplicate for each concentration. Cell viability was evaluated by WST-1 reagent and IC₅₀ values were calculated using GraphPad Prism 8 software. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey test using R software.

The results obtained suggest that panobinostat has a large cytotoxic effect on U87 and MCF7 cell lines. The active vectorized liposomal formulations have a cytotoxic effect similar to free formulation. In addition, it is suggested that panobinostat has no cytotoxic effects on the cell line of the BBB. Based on the results obtained in the BBB in vitro assay, it is assumed that G3 antibody (29.29%) is more effective in passing through BBB compared to FC5 (11.62%). In the BBB + U87 assay, the integrity of the barrier decreased, but a cytotoxic effect was observed on the U87 line. Optimizations of the new model, pre-clinical and translational studies will be required to determine the clinical utility and safety of liposomal panobinostat.

Keywords: BBB, brain tumor, immunoliposomes, nanomedicin, panobinostat

ÍNDICE

CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO	1
CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO	4
1. Introdução – Oncologia em Medicina Humana e Medicina Veterinária	4
2. Tumores Cerebrais.....	4
2.1. Classificação	5
2.1.1. Tumores intracranianos primários em Medicina Veterinária e Medicina Humana	5
2.1.1.1. Glioma	6
2.1.2. Tumores intracranianos secundários em Medicina Veterinária e Medicina Humana	7
2.1.2.1. Adenocarcinoma mamário	8
2.2. Sinais Clínicos e Diagnóstico.....	9
3. Terapêuticas Convencionais.....	9
3.1. Cirurgia	10
3.1.1. Desvantagens.....	10
3.2. Radioterapia	11
3.2.1. Desvantagens.....	11
3.3. Quimioterapia	12
3.3.1. Desvantagens e efeitos adversos	13
3.3.1.1. Mecanismos de resistência dos fármacos.....	14
4. Novas abordagens terapêuticas	16
4.1. Nanomedicina.....	16
4.1.1. Nanopartícula – lipossoma	17
4.1.2. Direcionamento ativo – <i>targeting</i>	18
4.2. Novas moléculas com atividade citotóxica em tumores	21
4.2.1. Inibidores das diacetilases das histonas (iHDAC)	21
4.2.1.1. Panobinostat.....	21
4.2.2. Doxorubicina Lipossomal.....	22
5. Barreira Hematoencefálica	23
5.1. Mecanismos de transporte de moléculas através da BBB	24
5.2. Mecanismos de resistência da BBB aos fármacos.....	25
5.3. <i>Targeting</i> para a BBB	25
5.3.1. Anticorpos de domínio único – FC5 e G3	26
5.4. Modelo BBB com células de glioblastoma humano (U87).....	28
6. Oncologia comparada.....	29
6.1. O cão e o rato como modelos animais	29
CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS PARA TRANSPORTE DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA BBB PARA O CÉREBRO.....	31
1. OBJETIVOS.....	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1. Linhas celulares.....	33

2.1.1.	Cultura e manipulação de células aderentes	33
2.2.	Fármacos.....	34
2.2.1.	Fármacos citotóxicos	34
2.2.2.	Encapsulação dos fármacos citotóxicos em lipossomas	34
2.3.	Identificação de moléculas de ligação para <i>Targeting</i>.....	34
2.3.1.	Extração da proteína	34
2.3.2.	Quantificação do extrato de proteína	35
2.3.3.	Preparação das amostras.....	35
2.3.4.	SDS-PAGE	35
2.3.5.	Western Blot	35
2.4.	Ensaio de Citotoxicidade	36
2.4.1.	Ensaio de citotoxicidade de células aderentes U87	36
2.4.2.	Ensaio de citotoxicidade de células aderentes MCF7 – otimização do protocolo	37
2.4.3.	Ensaio de citotoxicidade de células aderentes bEnd.3 – otimização do protocolo	37
2.5.	Modelo BBB	38
2.5.1.	Otimização do protocolo	38
2.5.2.	Preparação do ensaio da BBB.....	38
2.5.3.	Avaliação da integridade da barreira celular	39
2.5.4.	Ensaio da eficiência de passagem no modelo da BBB <i>in vitro</i>	40
2.5.5.	Ensaio da eficiência de passagem no modelo BBB + U87 <i>in vitro</i>	41
2.5.5.1.	Quantificação da viabilidade celular nas U87.....	42
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1.	Avaliação da presença do recetor do folato nas linhas celulares – U87, MCF7 e bEnd.3.....	43
3.2.	Seleção do fármaco e desenvolvimento de lipossomas – encapsulação do fármaco	44
3.3.	Avaliação da atividade citotóxica dos fármacos	45
3.3.1.	Glioblastoma Humano	45
3.3.2.	Adenocarcinoma Mamário Humano.....	49
3.3.2.1.	Otimização do protocolo experimental – número de células	49
3.3.2.2.	Otimização do protocolo experimental – concentração de fármaco	50
3.3.3.	Células Endoteliais Cerebrais de Rato.....	53
3.3.3.1.	Otimização do protocolo experimental – tempos de tratamento.....	54
3.4.	Modelo BBB <i>in vitro</i>.....	55
3.4.1.	Otimização do protocolo experimental – número de células U87	58
3.4.2.	Integridade da barreira no modelo <i>in vitro</i>	58
3.4.3.	Eficiência de passagem dos compostos no modelo <i>in vitro</i>	60
3.4.4.	Viabilidade celular das células U87	61
4.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
BIBLIOGRAFIA		66

ANEXO I – GRÁFICOS E TABELAS RELATIVOS À ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE PANOBINOSTAT NA FORMA LIVRE, PANOBINOSTAT NA FORMA LIPOSSOMAL E PANOBINOSTAT NA FORMA LIPOSSOMAL COM PEG-FOLATO EM U87.	81
--	----

ANEXO II – GRÁFICOS E TABELAS RELATIVOS À ANÁLISE ESTATÍSTICA PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE PANOBINOSTAT NA FORMA LIVRE, PANOBINOSTAT NA FORMA LIPOSSOMAL E PANOBINOSTAT NA FORMA LIPOSSOMAL COM PEG-FOLATO EM MCF7.	83
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos gliomas primários do SNC no Homem.	6
Figura 2 - Mecanismos de resistência das células neoplásicas aos quimioterápicos.....	15
Figura 3 - Lipossoma coberto com polímeros PEG e fármacos encapsulados.	17
Figura 4 - Mecanismos de transporte de moléculas através da barreira hematoencefálica. .	24
Figura 5 – Representação esquemática de anticorpos com interesse biotecnológico e clínico, de humanos e camelos.	27
Figura 6 - Representação esquemática das fases do desenho experimental.	32
Figura 7 - Esquema representativo dos ensaios de citotoxicidade realizados.	37
Figura 8 - Esquematização do modelo proposto para avaliação da passagem dos lipossomas através da BBB e citotoxicidade nas U87.	38
Figura 9 - Esquematização do ensaio realizado da BBB <i>in vitro</i>	40
Figura 10 - Esquematização das etapas do ensaio realizado da BBB <i>in vitro</i>	41
Figura 11 - Esquematização do ensaio realizado da BBB + U87 <i>in vitro</i>	42
Figura 12 - Esquematização do ensaio realizado da BBB + U87, especificando o passo da quantificação da viabilidade celular.	43
Figura 13 - Avaliação da presença de folato e tubulina nas linhas celulares U87, MCF7 e bEnd.3, Western Blot.	44
Figura 14 - Ensaio de citotoxicidade realizado na linha celular U87 de glioblastoma humano.	46
Figura 15 – Efeito citotóxico das formulações de panobinostat em U87.	46
Figura 16 - Representação gráfica dos efeitos citotóxicos da formulação de panobinostat encapsulado em lipossoma, em duas concentrações diferentes de MCF7.....	50
Figura 17 - Imagem representativa do ensaio de citotoxicidade realizado na linha celular MCF7 de adenocarcinoma mamário humano.....	51
Figura 18 - Representações gráficas do efeito citotóxico das formulações de panobinostat em MCF7.	51
Figura 19 - Representação gráfica comparativa da viabilidade celular da linha bEnd.3 sob exposição do panobinostat livre em 3 tempos de exposição diferentes.....	54
Figura 20 - Representação gráfica comparativa da viabilidade celular da linha bEnd.3 sob exposição das várias formulações de panobinostat com o tempo de exposição de 24h.....	55
Figura 21 - Esquematização do modelo da BBB <i>in vitro</i> e células U87 proposto.....	56
Figura 22 - Ligação do anticorpo ao lipossoma através da técnica de ligação biotina-estreptavidina-biotina.	57
Figura 23 - Representação gráfica dos efeitos citotóxicos do panobinostat livre nas células U87 em P24.	58

Figura 24 - Representação gráfica dos resultados obtidos da avaliação da integridade da BBB (%) após a atuação dos vários compostos, nos diferentes tempos de exposição.....	59
Figura 25 - Representação gráfica dos resultados obtidos da eficiência de passagem (%) dos vários compostos, nos diferentes tempos de exposição.	61
Figura 26 - Representação gráfica dos efeitos citotóxicos do panobinostat livre na linha celular U87, em dois tempos de exposição diferentes.	62
Figura 27 - Esquematização do sistema de entrega de fármacos com duplo direcionamento ativo transversal a Medicina Veterinária e Medicina Humana.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da OMS dos gliomas difusos em 2007.....	7
Tabela 2 - Protocolos e fármacos mais utilizados para tratamento de gliomas de elevado grau (III-IV).	13
Tabela 3 - Alguns fármacos utilizados em quimioterapia, os seus possíveis efeitos adversos e formas de prevenção em Medicina Humana e Medicina Veterinária.	14
Tabela 4 – Formulações lipossomais de fármacos anti-neoplásicos aprovados pela <i>Food and Drug Administration</i> (FDA) para tratamento anti-neoplásico em Medicina Veterinária.	18
Tabela 5 - Composição lipídica dos lipossomas.	34
Tabela 6 - Valores de IC50 (μM) de cada formulação testada em U87.....	47
Tabela 7 - Valores de IC50 (μM) de cada formulação testada em MCF7.	52

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Fórmula utilizada para o cálculo da % de integridade da BBB do ensaio <i>in vitro</i> .	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais ou menos
®	Marca registada
ABC	<i>Adenosine Triphosphate-Binding Cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJs	<i>Adherens Junctions</i>
AMT	<i>Absortive-Mediated Transcytosis</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
BBB	<i>Blood-brain barrier</i>
bEnd.3	Linha de células endoteliais de capilares cerebrais de rato
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C6	Linha celular de Glioma de Rato
CLBL-1	Linha celular de Linfoma Canino
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
COX-2	Ciclo-Oxigenase 2
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dose Máxima Tolerada
dNP2	Dipéptido NP2
DTRSF	Doença do Trato Respiratório Superior Felino
ECG	Eletrocardiograma
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention effect</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Fc	Fragmento cristalizável
FCT	Fundação para a Ciência e Tecnologia

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FeLV	<i>Feline Leukemia Virus</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>
FMV-UL	Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa
FR	<i>Folate Receptor</i>
<i>g</i>	Força gravitacional
HDAC	<i>Histone Deacetylases</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i>
HEV	Hospital Escolar Veterinário
IARC	<i>International Agency for Research of Cancer</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória que mata 50% das células
IgG	Imunoglobulina G
iHDAC	<i>Inhibitor of Histone Deacetylases</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
JAMs	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>
kDa	kilodalton
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
M	Molar
mA	Miliamperes
MAN	<i>p-aminophenyl-α-d-mannopyranoside</i>
MCF7	Linha celular de Adenocarcinoma Mamário Humano
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIMV	Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanómetros
°C	Graus Celsius

P24	Placa de 24 poços
P96	Placa de 96 poços
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEG	Polietilenoglicol
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
pH	Potencial de Hidrogénio
PIC	Pressão Intracraniana
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
RMT	<i>Receptor-Mediated Transcytosis</i>
rpm	Rotações por minuto
sdAbs	<i>Single-Domain Antibodies</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TB	<i>Transport Buffer</i>
TC	Tomografia Computorizada
TfR	<i>Transferrin Receptor</i>
TJs	<i>Tight Junctions</i>
TrisHCL	<i>Tris Hydrochloride</i>
U87	Linha celular de Glioblastoma Humano
UIDI	Unidade de Isolamento de Doenças Infectocontagiosas
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VH	<i>Variable Heavy chain</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

CAPÍTULO I – DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

O estágio curricular realizado com o objetivo de obter a aprovação para o grau de mestre do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) foi realizado entre 17 de Setembro de 2018 e 21 de Dezembro do mesmo ano na Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas (UIDI) e entre 4 de Fevereiro de 2019 e 6 de Julho do mesmo ano no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da FMV-UL. Além disso, foi realizado um estágio remunerado, mediante o programa Estagiar U do Governo dos Açores, de 24 de Julho de 2019 a 5 de Setembro do mesmo ano na Clínica Veterinária do Faial nos Açores.

Durante o estágio curricular na UIDI sob a orientação da Professora Doutora Solange Gil e acompanhamento clínico pela Dra. Inês Machado, com uma carga total de 638 horas, a autora teve oportunidade de desenvolver capacidades em internamento de cuidados intensivos a animais com diagnóstico confirmado de doença infectocontagiosa e cuidados intermédios a animais com estatuto sanitário desconhecido ou sintomatologia clínica suspeita de doença infectocontagiosa. Nesta unidade foram realizados serviços de monitorização dos animais por exame físico de estado geral com o devido material de proteção: bata, luvas, máscara, proteção para os pés e touca, sendo todo o material descartável e trocado entre cada animal, em ambiente de pressão negativa; alimentação dos mesmos quer por via oral, por entubação nasogástrica ou por entubação esofágica; higienização quando necessário dos animais tanto como das suas jaulas com as devidas medidas de precaução e produtos específicos utilizados, ou mesmo de feridas ou fraturas expostas, bem como a realização de pensos simples ou duros nestas; preparação de medicação e a sua respetiva administração segundo a prescrição do médico veterinário assistente; colheita e envio de amostras biológicas como sangue, zaragatoas retais, zaragatoas oro-nasais e conjuntivais para exames complementares hematológicos, bioquímicos e de cariz infeccioso; assistência em consultas de referência em Infectocontagiosas realizadas na UIDI pela Dra. Inês Machado, tanto de acompanhamento após internamento como consultas de primeira e segunda opinião; acompanhamento clínico de cães com Parvovirose, Esgana, Hepatite Infecciosa canina, Leptospirose, Mycoplasma e de gatos com *Feline Immunodeficiency Virus* (FIV), *Feline Leukemia Virus* (FeLV), Coronavírus, Panleucopénia Viral, Doenças do Trato Respiratório Superior Felino (DTRSF) incluindo Herpesvírus e Calicivírus, entre outras afeções não infecciosas; acompanhamento e assistência em procedimentos de mini-cirurgia na UIDI. A autora também realizou quatro apresentações orais de casos clínicos, abordando a história clínica do animal, os diagnósticos diferenciais, plano de diagnóstico, diagnóstico mais provável e tratamento. Além disto, ainda teve oportunidade de realizar procedimentos como medição de glucose,

microhematócrito, drenagem de líquido abdominal, algaliação, realização de enemas, vacinação, medição da pressão arterial, colocação de cateter venoso e colheita de sangue e urina.

Também foi realizado o acompanhamento dos animais internados na UIDI a vários serviços do Hospital Escolar Veterinário (HEV) como: a Radiologia com ajuda no posicionamento do animal com a proteção adequada e interpretação da radiografia recorrendo à ajuda do médico veterinário; a Ecografia com ajuda no posicionamento do animal, interpretação do observado e realização de lista de diagnósticos diferenciais e diagnóstico mais provável, observação da realização de cistocentese, colecistocentese e punção aspirativa por agulha fina (PAAF) a vários órgãos, tanto como a interpretação clínica dos resultados obtidos das análises efetuadas (urina tipo II, urocultura, citologia, entre outros); e a Oftalmologia auxiliando no exame geral ocular e realizando o tratamento ocular no internamento.

No segundo semestre, a autora integrou o grupo de investigação do Doutor Frederico Aires da Silva e sob sua orientação e acompanhamento da Doutra Joana Dias e restantes colegas realizei o trabalho experimental no âmbito do projeto da BBB (blood-brain barrier), com uma carga total de aproximadamente 500 horas. Neste período a autora realizou os trabalhos práticos que culminaram na realização desta dissertação de mestrado. Ao longo deste estágio foram adquiridos conhecimentos práticos em cultura e manipulação de células, tanto em linhas celulares em suspensão (CLBL-1) como em linhas celulares aderentes (U87, MCF7, bEnd.3). Realizou ensaios de citotoxicidade *in vitro* e outras técnicas laboratoriais como o SDS-PAGE e o *Western Blot*, obteve extrato total de proteína de amostras celulares e a sua respetiva quantificação pelo método Bradford, teve a oportunidade de realizar e manipular o modelo *in vitro* da BBB bem como a realização de ensaios de citotoxicidade do modelo. Este foi um período em que adquiriu capacidade para o manuseamento do material de laboratório e conhecimento sobre reagentes, materiais e rotina do laboratório. A autora teve ainda oportunidade de observar as técnicas laboratoriais realizadas pelas colegas de laboratório como ELISA, *Phage Display*, cultura bacteriana e respetivos ensaios de citotoxicidade, entre outros.

Por fim, a autora realizou um estágio na Clínica Veterinária do Faial, sob orientação do Dr. Hugo Carvalho, no período compreendido entre 24 de Julho de 2019 e 6 de Setembro do mesmo ano, com uma carga total de aproximadamente de 175 horas. Neste período teve a oportunidade de adquirir conhecimento sobre medicina interna, participando em diversas consultas de várias áreas: consultas de vacinação e desparasitação; diagnóstico e instituição de tratamento bem como o acompanhamento de casos clínicos em várias áreas

como dermatologia, infecciosas, cardiologia, gastroenterologia, urologia, entre outros; recolha de sangue para hemograma e bioquímicas e realização destes testes no laboratório da clínica; avaliação ecográfica e realização de cistocentese ecoguiada; avaliação radiográfica; acompanhamento de animais em internamento com respetiva administração de medicação e cuidados básicos; participou em cirurgias como castrações de cão e gato e ovariectomia (OVH) de cadelas e gatas.

CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO

1. Introdução – Oncologia em Medicina Humana e Medicina Veterinária

Tanto no Homem como nos animais o cancro apresenta um grande impacto a nível global. Este representa uma das principais causas de morte estimando-se que, em 2018, cerca de 9,6 milhões de mortes em humanos ocorreram devido ao mesmo. Assim, aproximadamente 1 em cada 6 mortes em humanos são devidas a cancro (Ferlay and S.I. 2013), sendo que em cães as estatísticas apontam para 1 em 3 mortes (Pang and Argyle 2009).

O desenvolvimento do cancro baseia-se num grupo de células que perdem o controlo intrínseco do seu crescimento e divisão, podendo metastizar para outros locais do corpo, sendo esta na maior parte das vezes, a fase terminal da doença (Pang and Argyle 2016). O Sistema Nervoso Central (SNC) é um alvo frequente de metástases de cancros sistémicos (Pérez-Larraya and Hildebrand 2014). Porém, nos últimos 25 anos, a biologia molecular tem revelado avanços exponenciais, no sentido da melhor compreensão dos mecanismos de crescimento e metastização dos tumores, permitindo desenvolver fármacos com ação direcionada a estas células (Pang and Argyle 2016). Devido à grande similaridade citológica, patológica e fisiológica entre o Homem e os animais, estes têm vindo a ser modelos para estudo de determinadas afeções, tendo a Medicina Humana e Medicina Veterinária um objetivo comum, a participação ativa na saúde pública (Ryu et al. 2017). Apesar da evolução na prevenção e tratamento do cancro nas últimas décadas, este ainda continua a ser uma das principais causas de morte (Lopez et al. 2006).

2. Tumores Cerebrais

O termo tumor cerebral refere-se a todas as neoplasias originadas nas diferentes células que constituem o cérebro, podendo ser benignas ou malignas (Butowski 2015). Estas incluem neoplasias com origem: no tecido parenquimatoso cerebral como os neurónios e as células da glia; nas células que constituem as membranas que revestem o cérebro como as meninges e o epêndima; bem como nos elementos vasculares como o plexo coróide (Dewey and da Costa 2016).

As neoplasias do SNC representam cerca de 2% de todos os tipos de cancro em humanos, ocorrendo frequentemente uma elevada taxa de morbilidade e mortalidade (Ostrom et al. 2014). No Homem, o pico da sua prevalência, ocorre entre os 55 e 64 anos de idade, com uma incidência ligeiramente maior em homens do que em mulheres (Perkins and

Liu 2016). Por sua vez, no cão, os tumores cerebrais são mais prevalentes em animais mais velhos com uma média de 9 anos de idade (Ettinger et al. 2017).

Embora a nível global os tumores cerebrais não sejam dos mais representativos, estes despertam a atenção dos investigadores por na maioria das vezes apresentarem um mau prognóstico e pela sua má resposta à terapêutica (Lacy et al. 2012; Jacques and Cormac 2013).

2.1. Classificação

Os tumores cerebrais podem ser classificados em primários ou secundários. Os tumores cerebrais primários têm como local de origem o cérebro. Os tumores cerebrais secundários são metástases cerebrais com origem num tumor primário de outro órgão ou tecido.

2.1.1. Tumores intracranianos primários em Medicina Veterinária e Medicina Humana

Os tumores intracranianos primários incluem inúmeros tipos de tumores com características histológicas e moleculares diferentes, podendo surgir: nas meninges, tecidos neuroepiteliais, hipófise e estruturas relacionadas, nervos cranianos, células germinativas e vasos sanguíneos. São relativamente raros em adultos, sendo mais prevalentes em crianças (Perkins and Liu 2016). Segundo um estudo de Howlader et al. (2014), os tumores cerebrais primários corresponderam a 1,4% de todos os novos casos de cancro e 2,4% de todas as mortes dessa doença no Homem, não existindo dados concretos em Medicina Veterinária.

Os tumores cerebrais primários mais comuns em Medicina Humana são os gliomas (Figura 1), seguidos pelos meningiomas que representam aproximadamente 30% (Dorsey et al. 2014). Por outro lado, em Medicina Veterinária os mais comuns são os meningiomas, que compreendem cerca de 50% do total dos tumores cerebrais primários em cães e gatos. Estes são seguidos pelos gliomas que representam aproximadamente 30 a 40% e, em terceiro lugar, os tumores do plexo coróide (Ettinger et al. 2017).

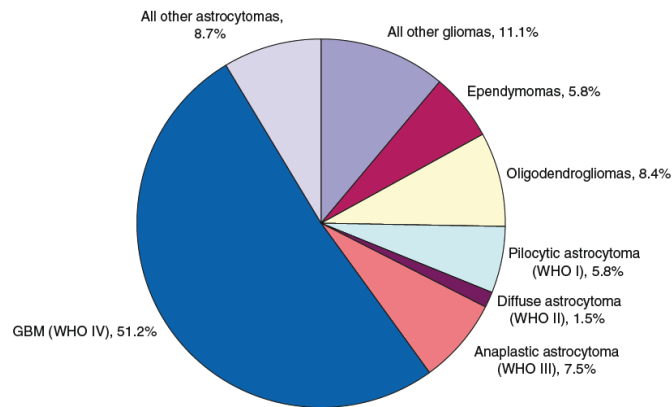


Figura 1 - Distribuição dos gliomas primários do SNC no Homem (adaptado de CBTRUS 2018).

No Homem, a incidência de tumores cerebrais primários é de 10,82 por 100.000 pessoas/ano (de Robles et al. 2015), sendo esta semelhante em veterinária com 14,5 em 100.000 cães/ano (Ettinger et al. 2017).

As neoplasias intracranianas primárias raramente metastizam, mas mais prováveis de metastizar são os meningiomas e os gliomas malignos (Hsu et al. 1998). Os gliomas são o tipo de tumor cerebral primário maligno mais comum no Homem, afetando cerca de 80% dos doentes que padecem de tumores cerebrais (Dolecek et al. 2013).

2.1.1.1. Glioma

Os gliomas são um grupo de neoplasias que têm origem nas células da glia. Dentro deste grupo e dependendo da célula afetada, apresentam várias denominações: astrocitoma (incluindo o glioblastoma), oligodendroglioma e ependimoma. Os gliomas representam cerca de 30% de todos os tumores cerebrais humanos, sendo a sua maioria de crescimento rápido (Dorsey et al. 2014). Estes tipos de tumores são classificados pela *World Health Organization* (WHO) em 4 graus (WHO 2007), que se definem pelo seu grau de indiferenciação, anaplasia e agressividade. Os tumores de maior grau estão associados a um pior prognóstico (Louis et al. 2007; Butowski 2015). Além desta classificação, as características morfológicas, o padrão de crescimento e o perfil molecular que a neoplasia apresenta, confere-lhe um grau de malignidade (Perkins and Lui 2016).

Tabela 1 - Classificação da OMS dos gliomas difusos em 2007 (adaptado de WHO 2007).

Tipo	Grau	Descrição	Média de sobrevivência (anos)
Astrocitoma	II	Encontrado difusamente infiltrado no tecido cerebral, hiper celularidade aumentada, sem mitose	6-8
Oligodendroglioma	II	Ocorre na substância branca e no córtex dos hemisférios cerebrais, baixa atividade mitótica, sem necrose	12
Oligoastrocitoma	II	Tumor misto difuso com fundo glial misto	3 até >10
Astrocitoma anaplásico / Oligodendroglioma	III	Tumores altamente infiltrativos com atividade mitótica aumentada, sem necrose ou proliferação vascular	3
Glioblastoma	IV	Neoplasia glial infiltrativa com necrose e proliferação microvascular, elevada taxa de mitose	1 a 2

O glioblastoma multiforme (WHO IV) é dos tumores cerebrais primários malignos mais comuns no Homem, o que apresenta maior malignidade e menor tempo médio de vida (Adamson et al. 2009). Este tumor afeta os astrócitos, sendo classificado como um astrocitoma de grau IV na escala de classificação de gliomas difusos da WHO (Hsu et al. 1998). As suas características de malignidade estão relacionadas com: o seu crescimento infiltrativo, difuso e expansivo no tecido cerebral (Scherer 1940); a necrose do tecido subjacente; a infiltração das células neoplásicas na vasculatura adjacente; e a sua resistência à terapêutica convencional (Hsu et al. 1998; McEntee and Dewey 2013). No Homem, este tipo de neoplasia é agressiva e a sobrevivência esperada é de 6 a 12 meses (Surawicz et al. 1998). Estatisticamente, apenas cerca de 2 a 5% dos doentes sobrevivem mais de 5 anos (Adamson et al. 2009). Em cães, o tempo médio de vida é de apenas 56 dias após o diagnóstico (Turrel et al. 1984), ocorrendo predisposição racial dos braquicéfalos como o *Bulldog* Francês (Ettinger et al. 2017).

Notavelmente, existe uma grande semelhança neuropatológica entre o glioma canino e humano, desta forma o cão é considerado um bom modelo de estudo fisiopatológico e de novas abordagens terapêuticas nesta área (Candolfi et al. 2007).

2.1.2. Tumores intracranianos secundários em Medicina Veterinária e Medicina Humana

Todos os tumores malignos podem metastizar no cérebro. Porém, as principais neoplasias responsáveis por mais de 75% das metástases cerebrais, são: o cancro do pulmão, responsável por mais de 50%; o cancro da mama; e o cancro de pele (De Angelis and Posner 2009; Davis et al. 2012). Esta informação vai de encontro aos estudos de

Kikuchi et al. (2006) e Algibes et al. (2005), que permitiram identificar uma maior predisposição para metastização nas neoplasias primárias do pulmão e da mama.

No desenvolvimento de metástases ocorre a libertação de células do tumor primário (Bremmes et al. 2002) e a sua entrada na circulação sanguínea (Chang et al. 2000). De seguida ocorre a sua retenção nos microvasos cerebrais devido ao seu pequeno diâmetro e extravasamento destas para o meio circundante (Kienast et al. 2010). As características do microambiente cerebral (Preusser et al. 2012) e a produção de fatores de crescimento e a angiogénese, promovem a proliferação e a sobrevivência das células neoplásicas no cérebro (Marchetti et al. 2003; Kienast et al. 2010).

A incidência exata das metástases cerebrais é desconhecida. A maior parte dos estudos subestimam-na, devido a alguns dos portadores se manterem assintomáticos ou os sintomas passarem despercebidos (Gavrilovic and Posner 2005). Segundo dados recolhidos de autópsias e estudos clínicos, é sugerido que as metástases cerebrais ocorrem em cerca de 10 a 30% dos pacientes adultos diagnosticados com doença sistémica maligna (Posner and Chernik 1978; Schouten et al. 2002). As metástases intracranianas representam assim uma complicação frequente, com diminuição da qualidade de vida do paciente e mau prognóstico da doença. Estas tem sido cada vez mais diagnosticadas devido ao aumento da esperança média de vida que predispõe ao desenvolvimento de doenças crónicas, ao uso mais rotineiro da neuroimagem e ao recurso de terapêuticas que podem predispor ao desenvolvimento de neoplasias (Shi et al. 2006). Comummente, realiza-se o diagnóstico da neoplasia primária antes do das metástases, mas o contrário também pode ocorrer (Pérez-Larraya and Hildebrand 2014).

É importante salientar que os tumores primários e as suas metástases podem apresentar características biológicas diferentes (Morita et al. 1998). Geralmente, as metástases são sólidas e bem circunscritas (Wesseling et al. 2007). Porém, podem apresentar um carácter infiltrativo e nos casos mais graves pode ocorrer infiltração difusa (Baumert et al. 2006), sendo alvos desafiadores para a terapêutica e prevenção.

2.1.2.1. Adenocarcinoma mamário

O cancro da mama é o segundo tipo de cancro mais comum em todo o mundo e o que mais afeta as mulheres (André et al. 2014). Estima-se que em Portugal a sua incidência seja cerca de 70 casos em 100.000 pessoas/ano, sendo esperado que a sua incidência duplique nos próximos 50 anos (IARC 2018). Porém, a mortalidade inerente tem vindo a diminuir, apresentando a maioria dos casos de neoplasia mamária um bom prognóstico (Edwards et al. 2005).

O adenocarcinoma mamário é uma neoplasia maligna das células epiteliais glandulares, que apresenta características invasivas e elevada probabilidade de metastização (Shi et al. 2006). Existem vários subtipos moleculares de adenocarcinomas mamários, sendo que o seu prognóstico depende destes.

2.2. Sinais Clínicos e Diagnóstico

Na sua maioria, os tumores cerebrais podem danificar os tecidos adjacentes ou deslocá-los por compressão, provocando efeito massa. A disrupção da barreira hematoencefálica pelo tumor provoca edema, o que também favorece um aumento do efeito massa (Algibes et al. 2005; DeAngelis and Posner 2009). Os sinais clínicos iniciais são mais generalizados, incluindo: dor de cabeça, que se agrava com ações que aumentem a pressão intracraniana (PIC) (Forsyth and Posner 1993); alterações cognitivas e comportamentais; convulsões e sintomatologia de aumento da PIC como sonolência, náusea, vômito e papiledema (Algibes et al. 2005). Outros sintomas podem ocorrer dependendo da localização do tumor incluindo fraqueza dos membros, distúrbios na linguagem, *déficit* visual, perda de memória, dificuldade na concentração e alterações na personalidade (Kaal et al. 2005). No caso do cão, os mais comuns são, progressivamente: a ataxia, o *circling*, a alteração comportamental, convulsões, coma ou até morte (Ettinger et al. 2017).

A sintomatologia inicial é inespecífica, por isso como abordagem inicial de diagnóstico são realizadas análises clínicas e possivelmente radiografia ao crânio ou à coluna vertebral, dependendo dos sinais clínicos que o doente apresente. O diagnóstico definitivo de tumores cerebrais é realizado através da Tomografia Axial Computorizada (TAC), Ressonância Magnética (MRI), Tomografia por Emissão de Positrões (PET) e biópsia com histopatologia (Fink et al. 2015). A TAC é o *gold standart*, visto que é o meio de diagnóstico mais acessível economicamente para os doentes, apesar de dar menos precisão que a MRI. Na TAC pode-se observar a alteração da posição anatômica dos tecidos, indicando a presença do efeito massa (Fink et al. 2015).

3. Terapêuticas Convencionais

A terapêutica convencional nos tumores cerebrais tem como objetivo a remoção completa da massa ou a diminuição do seu tamanho e o controlo dos seus efeitos secundários. A abordagem terapêutica depende das características do tumor, da sua localização e do seu prognóstico, incluindo cuidados paliativos e definitivos.

O tratamento paliativo consiste em minimizar os sinais clínicos, controlando essencialmente o edema cerebral e as convulsões. Os corticosteróides em dose anti-

inflamatória e o manitol são substâncias utilizadas para diminuir a PIC, podendo ser utilizada a furosemida em casos mais graves para diminuir o edema. Se ocorrerem convulsões, poderá recorrer-se ao uso de anti-epiléticos.

O tratamento definitivo baseia-se na cirurgia conservativa quando o tumor apresenta características favoráveis para a sua remoção, isoladamente ou conjugada com radioterapia e/ou quimioterapia (Stupp et al. 2005; Weller et al. 2014; Perkins and Liu 2016).

Para determinar o plano terapêutico é necessária uma avaliação do doente. Esta é feita em relação ao tipo e grau histológico da neoplasia, a sua localização, o seu estadio, a existência de danos neurológicos e características relacionadas com o doente em relação à sua idade e estado de saúde (Fadul et al. 1988; Farese and Withrow 2013).

3.1. Cirurgia

Este tem como finalidade a diminuição do efeito massa e a tentativa de remoção física de todas as células neoplásicas, podendo ser uma terapêutica única ou conjugada. Pode também ser útil no diagnóstico, possibilitando a caracterização histológica e molecular da neoplasia. A cirurgia apresenta melhores resultados quando os tumores são de baixo grau e apresentam margens bem delimitadas, facilitando a extirpação total do tumor (Morris and Dobson 2001). O tratamento cirúrgico ainda é o tratamento de eleição para o glioma (Bastien et al. 2015).

As principais vantagens da cirurgia comparativamente às outras modalidades terapêuticas baseiam-se no facto desta não apresentar efeitos tóxicos, não ser carcinogénica nem imunossupressora e poderá ser curativa (Jermyn and Lascelles 2010).

3.1.1. Desvantagens

O insucesso do tratamento cirúrgico ocorre quando o tumor não é completamente removido, em que as células neoplásicas remanescentes podem multiplicar-se e promover a recidiva do tumor (Mangiola et al. 2010). Além disso, pode ocorrer a contaminação do tecido saudável com células neoplásicas no momento da remoção do tumor. A existência de metástases previamente à cirurgia também contribui para o insucesso terapêutico (Morris and Dobson 2001). Os principais avanços na oncologia cirúrgica têm-se baseado na definição de margens de excisão, para conseguir erradicar os diferentes tipos de tumores (Morris and Dobson 2001).

No caso de tumores infiltrativos com margens mal definidas, de alto grau e recorrentes com elevada taxa de crescimento e rápida evolução da doença, a cirurgia poderá não ser tão eficaz (Bacon et al. 2007). A localização e o tamanho do tumor são as principais limitações, podendo tornar a cirurgia impraticável (Farese and Withrow 2013).

3.2. Radioterapia

A radioterapia é amplamente utilizada no tratamento de neoplasias em pacientes humanos e é igualmente aplicável em Medicina Veterinária (Morris and Dobson 2001). Consiste na emissão de radiação ionizante que contém energia necessária para provocar a ionização de átomos dos tecidos e por consequência causar danos no ácido desoxirribonucleico (DNA), tanto de forma direta, como de forma indireta, com a formação de radicais livres. Posteriormente, ocorrem reações químicas que resultam numa quebra molecular capaz de danificar as células, induzindo apoptose ou mutações genéticas. Visto que a radiação ionizante é capaz de induzir a morte celular, esta é utilizada no tratamento de tumores (Morris and Dobson 2001; Green 2008; LaRue and Gordon 2013), sendo que as células variam na sua sensibilidade à radiação ionizante. Segundo Bergonié e Tribondeau (2003), a radiação é mais eficaz em células indiferenciadas e que apresentam elevado índice mitótico, como as células da medula óssea, reprodutivas, neoplásicas, entre outras.

A decisão de introduzir a radioterapia no plano terapêutico assenta em vários fatores: o tipo de tumor, a sua localização e o seu estadio (Green 2008; LaRue and Gordon 2013). A radioterapia poderá ser realizada de forma definitiva ou paliativa. A modalidade definitiva é utilizada quando a cirurgia se apresenta uma abordagem menos eficaz ou em combinação com outras técnicas que constituem o plano terapêutico. Esta consiste num protocolo mais prolongado de 4 a 6 semanas, com radiação fracionada em sessões diárias, o que resulta num controlo mais eficaz do crescimento tumoral. A modalidade paliativa é utilizada quando a abordagem definitiva não é eficaz ou o paciente apresenta metástases, ocorrendo o manejo da dor e a diminuição dos sinais clínicos. O seu protocolo consiste em sessões semanais durante 3 a 4 semanas, com uma maior dose de radiação por sessão (Green 2008; Tollet et al. 2015).

3.2.1. Desvantagens

A radiação ionizante não discrimina as células neoplásicas e as células sãs, atingindo ambas. Esta pode por si só ser carcinogénica, provocando alterações genéticas que podem desencadear a formação de células neoplásicas. A idade avançada, as características genéticas, o tecido incidido pela radiação e o plano de radioterapia utilizado, influenciam o desenvolvimento de tumores secundários à radioterapia (Hall and Wu 2003). Assim, é necessário realizar uma avaliação de risco, tendo em conta se a radioterapia irá proporcionar mais benefícios do que efeitos secundários indesejados (Green 2008).

Os efeitos secundários à radiação podem ser exibidos a curto prazo ou a longo prazo. Os efeitos a longo prazo normalmente envolvem tecidos de divisão mais lenta como o coração, os rins, o osso e o pulmão, podendo provocar necrose, fibrose, perda de função ou

mesmo morte destes tecidos. Os efeitos a curto prazo, ocorrem durante o tratamento ou pouco tempo após as sessões, afetando tecidos de divisão rápida como a mucosa oral, o epitélio intestinal e estruturas epiteliais dos olhos e da pele. Estes, na sua maioria, são auto-limitantes (LaRue and Gordon 2013).

Além disto, a radioterapia ainda é um processo dispendioso em Medicina Veterinária, existindo essencialmente em centros de referência (Morris and Dobson 2001).

3.3. Quimioterapia

A quimioterapia tem vindo a tornar-se um método de tratamento cada vez mais utilizado em oncologia em pequenos animais (Morris and Dobson 2001). Os fármacos anti-neoplásicos podem ser classificados quanto ao mecanismo de ação em específicos de fase ou não específicos de fase. Os específicos atuam numa determinada fase do ciclo mitótico das células, parando a sua multiplicação numa determinada etapa. Os não específicos provocam apoptose ou inibição do crescimento celular (Chun et al. 2013).

Esta abordagem permite a atuação a nível sistémico, sendo mais eficaz no caso de existirem metástases e em neoplasias sistémicas (Moore and Frimberger 2008). Pode realizar-se como terapia adjuvante, secundária à cirurgia ou radioterapia, atuando em micrometástases que possam ocorrer. Pode também ser utilizada como terapia neoadjuvante, nos casos em que é necessária uma diminuição da massa neoplásica para posterior realização de cirurgia ou sensibilização dos tecidos para a radioterapia (Withrow 2013). Esta é também utilizada como terapia única, sendo principalmente utilizada em tumores hematopoiéticos. Por fim, pode ainda ser utilizada como terapia paliativa com objetivo de diminuir os sinais clínicos e a dor (Moore and Frimberger 2008).

À semelhança das abordagens anteriores, é necessário conhecer o diagnóstico definitivo, o estadiamento clínico do tumor e doenças concomitantes antes de estabelecer o protocolo quimioterápico, fazendo as alterações necessárias de modo a ser mais eficaz para o doente (Moore and Frimberger 2008).

Atualmente, os protocolos quimioterápicos utilizam uma combinação de fármacos de forma a: diminuir a toxicidade; provocar a morte celular por mecanismos de ação diversos de modo a ser mais eficaz; administrar os fármacos na dose mais perto da dose máxima tolerada (DMT) possível (Chun et al. 2013); e, evitar a indução de mecanismos de resistência, utilizando fármacos com alvos diferentes (Scheithauer et al. 1975).

Os protocolos atualmente utilizados para gliomas de elevado grau (III-IV), como é o caso do glioblastoma, utilizam: a Temozolomida, a associação PVC (Procarbazina, Lomustina e Vincristina), a Lomustina em terapia única (Taal et al. 2015) e o Bevacizumab

que tem sido identificado como fármaco potencial de segunda linha e foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para doentes com glioblastoma recorrente (Braun and Ahluwalia 2017). Tanto a combinação PVC como a Lomustina têm sido preferidos em relação à Temozolomida em gliomas de elevado grau, devido à facilidade da toma e a diminuição dos efeitos secundários (Taal et al. 2015). Na Tabela 2 apresentam-se os protocolos e fármacos mais utilizados para tratamento quimioterápico de glioblastoma, em Medicina Humana e Medicina Veterinária.

Tabela 2 - Protocolos e fármacos mais utilizados para tratamento de gliomas de elevado grau (III-IV) (original da autora).

Protocolo/Fármaco	Mecanismo de Ação	Posologia e Indicações Terapêuticas	Fonte
Temozolomida	Alquilante ¹	Administrado nos dias 1 a 5 a cada 4 semanas Glioblastomas recorrentes e estadios avançados, standart	(Taal et al. 2015) (Thomas et al. 2017)
PVC (procarbazina, lomustina e vincristina)	Procarbazina e Lomustina: Alquilantes Vincristina: Antimitóticos ²	Ciclos de 6 a 8 semanas: lomustina no dia 1, procarbazina nos dias 8 a 21 e vincristina no dia 8 e 29 Gliomas de grau III	(Solimando and Waddell 2017) (Taal et al. 2015)
Lomustina	Alquilante	1 toma única a cada 6 semanas Glioblastoma	(KuKanich et al. 2017)
Bevacizumab	Anticorpo monoclonal ³	1 toma única a cada 2 semanas Glioblastoma recorrente	(Braun and Ahluwalia 2017) (Friedman et al. 2009)

Porém, todas estas abordagens terapêuticas para o glioblastoma apenas prolongam a vida do doente, sendo necessário continuar a pesquisa de novos fármacos e terapias direcionadas.

3.3.1. Desvantagens e efeitos adversos

As principais desvantagens que a quimioterapia apresenta são: os efeitos adversos devido à sua ação nos tecidos sãos, a indução de mecanismos de resistência aos fármacos, um baixo índice terapêutico e, o maior desafio no caso dos tumores cerebrais, a passagem da barreira hematoencefálica (BBB), sendo esta impermeável à maioria dos fármacos (Omidi and Barar 2012; Barar et al. 2016).

¹ Ligação covalente de grupos alquilo ao ADN.

² Provocam a inibição da formação do fuso mitótico.

³ Regula a angiogénese pela ligação com VEGF.

Os quimioterápicos não são específicos para as células neoplásicas, atuando assim também nas células sãs, podendo levar a efeitos adversos (Tabela 3) (Morris and Dobson 2001). A maioria atua apenas em células com elevado índice mitótico. Assim sendo, os efeitos adversos mais comuns são as alterações gastrointestinais e a supressão da medula óssea. Por norma, estas afeições são facilmente atenuadas ou revertidas, reduzindo a dose ou suspendendo o tratamento. Para uma maior eficácia dos planos terapêuticos, a dose administrada convém ser a mais próxima da DMT, sendo esta ajustada com base no histórico clínico do doente ou eventuais efeitos secundários que possam surgir (Morris and Dobson 2001; Withrow 2013).

Tabela 3 - Alguns fármacos utilizados em quimioterapia, os seus possíveis efeitos adversos e formas de prevenção em Medicina Humana e Medicina Veterinária (original da autora).

Fármaco	Efeito Adverso	Prevenção	Fonte
Doxorrubicina	Cardiotoxicidade	Cardioprotetores, radiografia torácica e ECG frequente	(Morris & Dobson 2001) (Cunha 2014) (Souza et al. 2018)
Ciclofosfamida	Cistite hemorrágica	Administrar de manhã, ingerir fluídos, esvaziamento frequente da bexiga e urianálise frequente	(Morris & Dobson 2001) (Cunha 2014) (Matz & Hsieh 2017)
Cisplatina	Nefrotoxicidade	Administrar com fluídos e urianálise frequente	(Lebwohl and Canetta 1998) (Morris and Dobson 2001)

Segundo o estudo de Cunha (2014), verificou-se uma clara predominância da toxicidade gastrointestinal e hematopoiética. Também a toxicidade dermatológica, reações anafiláticas/alérgicas, cistite hemorrágica estéril, necrose perivascular/extravasamento e cardiotoxicidade, foram identificados durante o estudo.

3.3.1.1. Mecanismos de resistência dos fármacos

O insucesso terapêutico da quimioterapia na sua generalidade é associado ao desenvolvimento de resistências pelas células neoplásicas aos fármacos utilizados (Eckford and Sharom 2009). Como por exemplo, um estudo de Chen et al. (1990) verificou que a linha celular MCF7, utilizada no estudo desta dissertação, é resistente à doxorrubicina na presença de verapamil (composto conhecido por inibir a função da glicoproteína-P).

Os mecanismos de resistência das células neoplásicas aos citotóxicos ocorrem em várias etapas: ao nível da entrada do fármaco na célula, da metabolização ou ativação do fármaco, do alvo dos fármacos, das vias de reparação dos danos do ADN ou

reconhecimento de danos já existentes e da resistência a múltiplos fármacos (*multi-drug resistance*) (MDR) (Figura 2) (Eckford and Sharom 2009; Housman et al. 2014).

Em relação à entrada dos fármacos na célula, podem ocorrer modificações nos transportadores celulares, o que impede a entrada dos citotóxicos, diminuindo a sua concentração intracelular. Além disto, pode ocorrer um aumento do número de bombas de efluxo, aumentando a saída do citotóxico para o espaço extracelular (Eckford and Sharom 2009).

Os fármacos podem ser dirigidos a um alvo na célula, responsável por reconhecê-los e permitir a sua internalização. Uma mutação numa proteína pode ser o suficiente para a alteração deste alvo, resultando na modificação de afinidade do fármaco para o alvo e consequentemente para a célula. Além disto, pode ocorrer um aumento ou diminuição da quantidade de alvos expressos, alterando a eficácia do citotóxico (Housman et al. 2014).

A metabolização ou ativação dos citotóxicos na célula pode reduzir ou aumentar a atividade destes, podendo afetar a farmacocinética do citotóxico (Wang and Tew 1985; Campling et al. 1993).

Demonstrou-se que o não desenvolvimento de neoplasias está também associado à reparação dos danos do ADN e ao reconhecimento dos danos já existentes, desencadeando uma resposta reguladora (Parker et al. 1991; Goldstein and Kastan 2015).

As células podem apresentar, em alguns casos, resistência a vários fármacos (MDR). Esta ocorre devido à expressão de transportadores *adenosine triphosphate-binding cassette* (ABC), que são proteínas transmembranares com a função de transportar uma variedade de substâncias através das membranas celulares. Estes transportadores são bombas de efluxo ATP dependentes, sendo que quando um substrato se liga ao domínio transmembranar ocorre a hidrólise do ATP, havendo uma alteração na conformação que provoca o efluxo do citostático (Eckford and Sharom 2009; Housman et al. 2014).

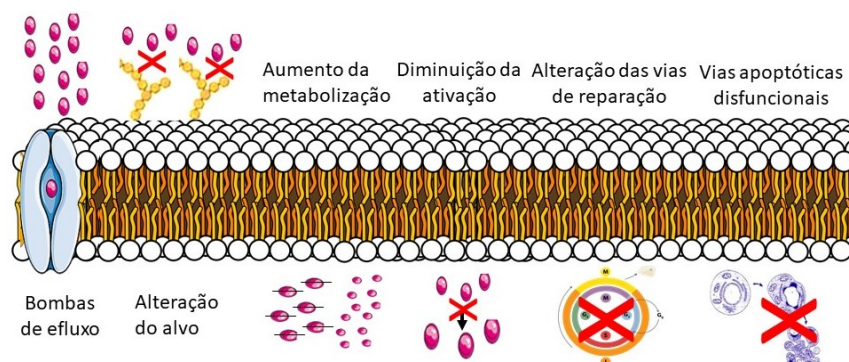


Figura 2 - Mecanismos de resistência das células neoplásicas aos quimioterápicos (original da autora).

4. Novas abordagens terapêuticas

As terapêuticas convencionais descritas e que são utilizadas têm desvantagens, que no caso dos tumores cerebrais, assentam em três pilares: a dificuldade dos fármacos para ultrapassar a barreira hematoencefálica e atingir o seu local de ação; a impossibilidade muitas vezes de realizar a ressecção completa da massa; e, a recorrência da doença devido à resistência aos fármacos antineoplásicos.

Muitos doentes apresentam uma boa resposta ao primeiro plano terapêutico instituído mas pode ocorrer recorrência da neoplasia (Hu and Zhang 2009). Assim surgiu a necessidade de investigar novas abordagens mais específicas e dirigidas aos locais das neoplasias, de modo a serem mais eficazes na morte das células neoplásicas, como é o caso da nanomedicina (Markman et al. 2013; Sadozai and Saeidi 2013).

4.1. Nanomedicina

A nanomedicina é um ramo da medicina que visa o desenvolvimento de materiais à nanoescala (1 a 100 nm) que permitem o transporte de substâncias através de barreiras biológicas, conseguindo atuar em locais que moléculas de maiores dimensões não conseguem atingir (Kim et al. 2010). Estes materiais – as nanopartículas - surgiram como uma ferramenta inovadora e promissora para combater as resistências aos fármacos, tendo demonstrado maior eficácia terapêutica e efeitos adversos reduzidos, comparativamente às abordagens convencionais (Hu and Zhang 2009).

As nanopartículas possibilitam a incorporação de moléculas ou substâncias como fármacos, agentes de deteção imagiológica e moléculas para direcionamento, úteis no diagnóstico e tratamento oncológico (Hu and Zhang 2009). Estas apresentam as vantagens de direcionar a entrega de substâncias às células ou locais pretendidos, de ultrapassar mecanismos de resistência, de aumentar o tempo de permanência em circulação dos fármacos, de promover uma libertação controlada das substâncias e reduzir os efeitos secundários ao diminuir o contacto dos fármacos com as células sãs (Hu and Zhang 2009; Jain and Stylianopoulos 2010), através do efeito de “aumento da permeabilidade e retenção” – EFR (*enhanced permeability and retention*) - que favorece a acumulação nos tecidos tumorais (Matsumura and Hiroshi 1986; Muggia 1999; Nehoff et al. 2014).

Os tumores cerebrais quer primários, quer secundários, devem ser tratados com fármacos que consigam ultrapassar a barreira hematoencefálica e que sejam capazes de atingir a sua concentração máxima no tecido cerebral. Tal não acontece, visto que, a maioria dos fármacos não apresenta as características necessárias para passar a BBB ou torna-se necessário a administração de doses elevadas que podem culminar em toxicidade. As

nanopartículas, neste caso específico, poderão revelar-se uma mais-valia (Markman et al. 2013).

4.1.1. Nanopartícula – lipossoma

Os diferentes tipos de nanopartículas existentes, foram desenvolvidos com diferentes objetivos. Entre eles encontram-se o lipossoma, o conjugado de polímeros, a micela orgânica, o dendrímero, o nanotubo de carbono e a nanopartícula dourada (Kim et al. 2010; Markman et al. 2013; Tran et al. 2017). Os lipossomas são considerados das nanopartículas mais promissoras, sendo estes o foco desta dissertação.

O lipossoma (Figura 3) é constituído por uma bicamada fosfolipídica vesicular e com forma esférica, biodegradável e biocompatível (Torchilin 2005; Hua and Wu 2013; Tran et al. 2017), sendo capaz de encapsular tanto substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas, conferindo-lhes estabilidade no meio (Torchilin 2005; Tran et al. 2017). O lipossoma é ainda capaz de modular a solubilidade, a degradação e a eliminação das substâncias encapsuladas (Hu and Zhang 2009). A eficácia dos lipossomas depende de alguns fatores como: o pH e a temperatura do meio, a sua composição lipídica (Roy et al. 2016), o seu tamanho, a sua eficácia de encapsulação e a sua carga elétrica (Torchilin 2005).

A superfície das nanopartículas pode ser coberta por polímeros inertes e hidrofílicos, de modo a aumentar a sua biocompatibilidade e seletividade (Lila and Ishida 2017). Um exemplo destes é o polietilenoglicol (PEG), que confere estabilidade à superfície do lipossoma ao formar uma camada protetora. Esta diminui a sua opsonização, reconhecimento e consequente fagocitose pelo sistema mononuclear fagocitário, aumentando assim o seu tempo de circulação (Allen et al. 2002; Markman et al. 2013; Lila and Ishida 2017). Os lipossomas podem ser conjugados também com anticorpos (Eloy et al. 2017) ou outras moléculas, que promovam o seu direcionamento e o seu reconhecimento pelas células tumorais (Ringhieri et al. 2017).

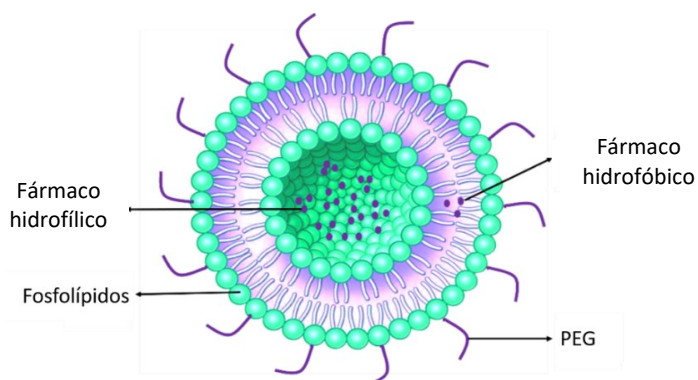


Figura 3 - Lipossoma coberto com polímeros PEG e fármacos encapsulados (original da autora).

Os compostos terapêuticos em formulações lipossomais, para utilização em Medicina Veterinária (Tabela 4), têm sido avaliados na última década e demonstraram ser altamente versáteis e relativamente fáceis de formular e modificar. Deste modo, a aplicação de lipossomas representa uma área cada vez mais promissora (Sadozai and Saeidi 2013).

Tabela 4 – Formulações lipossomais de fármacos anti-neoplásicos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento anti-neoplásico em Medicina Veterinária (original da autora).

<i>Espécie</i>	<i>Substância ativa</i>	<i>Tipo de cancro</i>	<i>Referências</i>
<i>Cão e gato</i>	Doxorrubicina	Sarcoma	(Kleiter et al. 2010; Teske et al. 2011)
<i>Gato</i>	mTHPC	Carcinoma das células escamosas	(Buchholz et al. 2005)
<i>Cão</i>	Clodronato	Histiocitose maligna	(Hafeman et al. 2010)
<i>Cão e gato</i>	Cisplatina	Osteossarcoma	(Thamm & Veil 1998; Marr et al. 2004)

4.1.2. Direcionamento ativo – *targeting*

Os lipossomas podem ainda ser vinculados a plataformas de direcionamento, o que possibilita uma vectorização ativa de compostos bioativos nas células tumorais. No direcionamento ativo - *targeting* - o desafio mais importante é definir o ligando mais apropriado de modo a garantir o transporte seletivo e bem-sucedido dos sistemas de nanopartículas para os tecidos tumorais, sem toxicidade associada. Deste modo, uma adaptação da superfície das nanopartículas com um ou múltiplos ligandos permite a ligação a um biomarcador sobreexpresso nas células alvo, de modo a desencadear a endocitose por parte do recetor e, conseqüentemente, distribuir os compostos terapêuticos nas regiões alvo (Bryne et al. 2008; Eloy et al. 2017; Ringhieri et al. 2017). Nos últimos anos, vários ligandos têm vindo a ser utilizados, incluindo anticorpos, fragmentos de anticorpos (Eloy et al. 2017), proteínas, péptidos (Alavi & Hamidi 2019), pequenas moléculas como a transferrina (Tortorella & Karagiannis 2014), o folato (Li et al. 2018) e a insulina (Luan et al. 2015). Os ligandos podem ser adicionados diretamente à superfície do lipossoma ou ao PEG (Riaz et al. 2018).

4.1.2.1. *Targeting* para as células tumorais

O *targeting* para estas células tumorais é realizado para os recetores sobreexpressos (Deshpande et al. 2013; Riaz et al. 2018), podendo ser alvos que permitem a internalização dos fármacos ou a libertação do fármaco na sua superfície (Nehoff et al. 2014). Alguns exemplos destes alvos são o recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Bryne et

al. 2008; Alavi & Hamidi 2019), o recetor da transferrina (TfR), o recetor do folato (FR), o recetor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) (Bryne et al. 2008), o recetor do fator de crescimento dos fibroblastos (FGFR), o recetor γ ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR- γ), a cicloxigenase-2 (COX-2), as mitocôndrias, os lisossomas, entre outros (Riaz et al. 2018).

Em relação aos gliomas, existem alguns estudos que avaliaram a eficácia de alvos como a transferrina, a insulina, o folato e anticorpos como potenciais alvos de direccionamento dos lipossomas.

As células neoplásicas apresentam uma sobreexpressão do receptor da transferrina (TfR) devido ao aumento do ferro necessário para a sua rápida proliferação. Alguns trabalhos reportaram um aumento da expressão deste receptor no glioma cerebral e demonstraram que o seu direccionamento ativo tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, representando assim uma boa opção para o tratamento desses tumores (Tortorella & Karagiannis 2014). Porém, por ensaios de citometria de fluxo, foi detetada uma baixa eficiência de ligação do ferro pelo ligando da transferrina ao TfR (Bellocq et al. 2003; Bryne et al. 2008). Também o receptor da insulina (IRS-1) se encontra sobreexpresso em vários tipos de cancro, incluindo o cancro do pâncreas, da mama e do cólon (Dearth et al. 2006; Luan et al. 2015). O estudo de Luan et al. (2015) demonstrou que existe também um aumento da expressão deste receptor no glioma cerebral, comparativamente ao tecido cerebral normal. Contudo, tanto o receptor da transferrina como o da insulina são expressos ubiquamente em tecido normal (Gatter et al. 1983; Dearth et al. 2006). Desta forma, a utilização destes recetores para a terapêutica direccionada do cancro é limitada, pela competição que possa ocorrer entre as moléculas fisiológicas e as nanopartículas, pelos recetores presentes nas células neoplásicas.

Por sua vez, o folato ou ácido fólico tem vindo a ser amplamente utilizado como ligando de vectorização ativa de nanotransportadores devido à sua fácil conjugação a lipossomas, à sua alta afinidade aos recetores do folato (FR) e à sua relativa baixa expressão em tecidos saudáveis quando comparada à sua expressão em células tumorais, revelando-se um marcador tumoral altamente seletivo e específico. O folato ao interagir com o FR promove a internalização deste por endocitose (Bryne et al. 2008; Nehoff et al. 2014; Kuo & Chen 2015). Esta molécula é amplamente utilizada porque além de ser economicamente a mais acessível, não apresenta toxicidade, não é imunogénica, é fácil de conjugar com as nanopartículas e apresenta alta afinidade de ligação (Bryne et al. 2008). A conjugação do folato com os lipossomas tem demonstrado uma maior eficácia no tratamento de neoplasias, em comparação com os lipossomas sem o ligando, consequente do aumento

da afinidade para as células neoplásicas (Shmeeda 2006). O estudo de Li et al. (2018) revelou um aumento significativo da citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* para as células neoplásicas, prolongando o tempo de sobrevivência dos murganhos portadores de glioma.

Os imunolipossomas surgem da ligação de anticorpos ou fragmentos de anticorpos (Paszko & Senge 2012), diretamente à superfície dos lipossomas ou ao PEG. Estes permitem um direcionamento ativo ao tecido neoplásico através da sua ligação aos epítopos presentes na superfície celular (Paszko & Senge 2012). A ligação do anticorpo ao receptor da célula neoplásica permite assim um *uptake* celular dos lipossomas mais seletivo e eficaz. Em vários estudos foi efetuada a avaliação da eficácia de vários imunolipossomas no tratamento do cancro. Um exemplo é o imunolipossoma com PEG ligado ao anticorpo monoclonal dirigido para o recetor HER2, sobreexpresso no carcinoma mamário em humanos e gatos (Soares et al. 2012) e em tumores gástricos, do cólon e ováricos em humanos (Park et al. 2002). Ambos os estudos apresentaram melhores resultados utilizando os lipossomas com o ligando.

Nos estudos mencionados anteriormente, a vectorização ativa realizada pelos ligandos foi realizada apenas com um tipo de molécula. Porém, esta pode não provocar o efeito biológico desejado, devido à modificação do alvo por mutações ou pela adoção de novos métodos de crescimento e multiplicação pela célula neoplásica. De forma a tentar contornar estas adversidades surgiu o *dual targeting* (Raghavendra et al. 2018).

4.1.2.2. Dual Targeting

Esta é uma estratégia que tem sido alvo crescente de interesse em investigação (Liu et al. 2018). O *dual targeting* consiste no direcionamento das nanopartículas para dois recetores diferentes específicos, colocando na superfície dessas mesmas nanopartículas, dois tipos de ligandos. Estes ligandos podem ser direcionados a células diferentes ou a compartimentos diferentes da mesma célula (Liu et al. 2018), aumentando assim a sua especificidade e promovendo uma penetração mais eficiente nos tecidos (Kontermann 2012; Liu et al. 2018).

A otimização de alguns parâmetros é essencial para assegurar a eficácia do *dual targeting*, tais como: o tamanho da partícula, a sua carga, a densidade dos ligandos, o rácio com que os ligandos são adicionados, a correspondência de comprimento dos dois ligandos, e as interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre eles (Liu et al. 2018).

O estudo de Loureiro et al. (2015) testou a eficácia de lipossomas com dois anticorpos diferentes na sua superfície, o anticorpo anti-transferrina e o anticorpo anti-A β . Os ensaios preliminares realizados, indicaram que esta combinação ultrapassou a barreira

hematoencefálica *in vivo*, tendo-se concluindo que os lipossomas conjugados com anticorpos são bastante promissores e com ampla aplicação no tratamento de doenças do SNC.

4.2. Novas moléculas com atividade citotóxica em tumores

4.2.1. Inibidores das diacetilases das histonas (iHDAC)

As diacetilases das histonas (HDAC) são enzimas que estão envolvidas na diacetilação reversível da cauda das histonas, resultando na inibição da afinidade eletrostática entre as histonas e o ADN, com consequente condensação da cromatina, desempenhando um papel importante na regulação da expressão genética (Gray & Ekström 2001; Khochbin et al. 2001; Buchwald et al. 2009; Eyüpoglu and Savaskan 2016). Estas podem atuar também em outras proteínas responsáveis pela regulação genética (Chun 2015). Por isso, podem apresentar um papel importante na expressão de oncogenes ou de genes supressores de tumores (Marks 2010). Em vários estudos, foi observado uma expressão aberrante das HDAC em células neoplásicas (Zhang et al. 2004; Sakuma et al. 2006), tendo sido a sua expressão diretamente relacionada com a agressividade do tumor, a invasão e a migração das células neoplásicas, sendo consideradas um indicador de mau prognóstico (Wang et al. 2001; Song et al. 2005; Hayashi et al. 2010; Park et al. 2011; Müller et al. 2013).

Os iHDAC provocam a hiperacetilação das histonas, sendo responsáveis pela paragem do crescimento e diferenciação celular, e pela apoptose celular (Marks et al. 2000; Chun 2015). Foi demonstrado que os iHDAC induzem alterações na estrutura da cromatina, promovem danos no ADN e inibem a sua reparação (Bakkenist and Kastan 2003), podendo também afetar a angiogénese tumoral (Kim et al. 2001). Um estudo de Ungerstedt et al. (2005) concluiu que as células saudáveis apresentam uma relativa resistência aos iHDAC, comparativamente às células tumorais. É notável ainda que existem fármacos convencionalmente utilizados em quimioterapia que exercem um efeito sinérgico com os iHDAC, como é o caso da dexametasona (Catley 2003), entre outros. Assim sendo, este grupo de fármacos apresenta um grande potencial para utilização em clínica, no tratamento de neoplasias (Chun 2015).

4.2.1.1. Panobinostat

O panobinostat, também conhecido por ácido valpróico, é um inibidor das diacetilases das histonas (iHDAC) e de outras proteínas. Em Fevereiro de 2015 foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), um medicamento para o tratamento do mieloma múltiplo humano, com o panobinostat associado à dexametasona e ao bortezomib (Veggel

et al. 2017). O panobinostat está atualmente a ser testado para o tratamento de outras neoplasias, como por exemplo: o linfoma das células B recidivante (Assouline et al. 2016), o cancro da mama (Tan et al. 2016), o cancro do pulmão (Takhar et al. 2015), o glioblastoma (Lee et al. 2015), entre outros. No caso do glioblastoma, o panobinostat foi testado em associação com o bevacizumab. Porém, não foram obtidos bons resultados devido à fraca penetração do panobinostat através da barreira hematoencefálica (Lee et al. 2015). De modo a ultrapassar esta limitação, poderá ser utilizada a encapsulação do fármaco numa nanopartícula, aumentando a sua penetração através da barreira (Singleton et al. 2017).

Com base nos estudos clínicos em humanos, foi possível obter algumas informações sobre a farmacocinética do panobinostat. A administração oral de 20mg de panobinostat apresenta o seu pico na concentração plasmática cerca de 0,5 a 3 horas após a toma (Clive et al. 2012; Fukutomi et al. 2012), sendo rapidamente absorvido. Este apresenta uma ligação às proteínas plasmáticas de 90% (Slingerland et al. 2014) e uma biodisponibilidade de 21,4% (Saveliera et al. 2015). É metabolizado através de várias reações, sendo que a redução, hidrólise, oxidação e glucoronidação são as mais notáveis, resultando em cerca de 77 metabolitos que não apresentam ação inibidora das HDAC (Fredenhagen et al. 2012). O panobinostat é eliminado a nível hepático, urinário e nas fezes (Veggel et al. 2017). A farmacocinética é influenciada pela insuficiência hepática que possa ocorrer, pelo citocromo P450 e pelas interações da Glicoproteína-P (Veggel et al. 2017). Foram reportados alguns efeitos adversos como: lesões hepáticas ligeiras a moderadas sendo recomendado a monitorização da atividade hepática ao longo do tratamento (Slingerland et al. 2014), diarreia, neuropatia periférica, astenia, fadiga (Veggel et al. 2017), náuseas, inapetência, vômitos, piroxia, perda de peso (San-Miguel et al. 2014) e sinais hematológicos como neutropénia, trombocitopenia e linfopenia (Veggel et al. 2017).

4.2.2. Doxorrubicina Lipossomal

A doxorrubicina apresenta efeitos citostáticos num largo espectro de tumores, comparativamente a outros fármacos. Os seus principais mecanismos de ação baseiam-se na produção de radicais livres pela ativação metabólica da doxorrubicina, em ações deletérias ao nível da membrana e na lesão do DNA.

Contudo, esta apresenta efeitos secundários como cardiotoxicidade e nefrotoxicidade (Speth et al. 1988).

De modo a ultrapassar estes efeitos adversos, a doxorrubicina foi encapsulada em nanopartículas, como o lipossoma. A primeira formulação lipossomal da doxorrubicina aprovada pela FDA em 1995 (Szebeni et al. 2016), foi o Doxil® (Gabizon et al. 2003), utilizado no tratamento do cancro ovárico e metastático da mama. Este foi capaz de reduzir

a captação da doxorubicina pelo sistema mononuclear fagocitário, aumentando o seu tempo de circulação e reduzindo a sua captação pelas células não neoplásicas, promovendo a sua ação no tumor. O fármaco encapsulado apresenta duas fases para a sua eliminação. O tempo de eliminação inicial é de 1-3 horas, em que é eliminado cerca de 30% do fármaco. A segunda fase, em que 95% do fármaco já foi eliminado, ocorre em aproximadamente 30 horas em cães e 45 horas no Homem (Gabizon et al. 2003). Os estudos de Gabizon et al. (2003) demonstraram que a biodisponibilidade do Doxil® (0,25-1,25%) é extremamente baixa comparativamente à formulação livre (40-50%) (Amantea et al. 1997), visto que o lipossoma apenas liberta a doxorubicina quando atinge o interstício celular. A baixa quantidade de fármaco livre em circulação, faz com que este apresente baixa cardiotoxicidade (Legha et al. 1982; Gabizon et al. 2003).

Os estudos de Rico (2018) demonstraram que a formulação lipossomal da doxorubicina é mais eficaz em glioblastoma comparativamente à formulação livre, o lipossoma poderá aumentar o transporte do fármaco através da barreira hematoencefálica.

5. Barreira Hematoencefálica

O SNC possui barreiras que promovem um microambiente cerebral estável, que é crítico para a complexa função neural e para a proteção deste contra agressões externas (Abbott et al. 2010). Existem três principais barreiras entre o cérebro e o sangue: a barreira hematoencefálica propriamente dita (BBB), constituída por complexos juncionais entre as células endoteliais dos capilares cerebrais (Nag and Begley 2005); a barreira sangue - líquido cefalorraquidiano (LCR), formada pela interface das células epiteliais do plexo coróide com o fluído cefalorraquidiano (Brown et al. 2004); e a barreira avascular da aracnóide (Abbott et al. 2006). Estas barreiras têm como função regular a composição iónica (Hansen 1985) e de neurotransmissores (Abbott et al. 2006; Bernacki et al. 2008) de forma a garantir que a transmissão sináptica do impulso nervoso ocorra, prevenir a entrada de diversas macromoléculas ou neurotóxicos (Gingrich and Traynelis 2000; Lim et al. 2007) e nutrir o cérebro (Abbott et al. 2006; Wolburg 2006).

A barreira hematoencefálica é a que apresenta a maior área, representando o mais importante local de trocas entre o cérebro e o sangue (Nag and Begley 2005). Tanto esta como as outras barreiras apresentam complexos juncionais entre as células, de forma a restringir a passagem de substâncias entre o cérebro e o sangue. Estes complexos juncionais são formados pelas *adherens junctions* (AJs) e pelas *tight junctions* (TJs). As AJs são constituídas pelas caderinas, que promovem a integridade estrutural e a ligação entre células (Wolburg and Lippoldt 2002). As TJs são um conjunto mais complexo de proteínas,

constituídas essencialmente pelas claudinas, ocludinas e moléculas junctionais de adesão (JAMs) (Wolburg and Lippoldt 2002; Wolburg et al. 2009). Estas são responsáveis pela restrição da difusão de iões e solutos polares entre as células endoteliais e pelo bloqueio da penetração de macromoléculas (Butt et al. 1990). As propriedades das TJs na BBB são moduladas por fatores produzidos localmente no SNC e circulantes, por isso estas sofrem frequentemente modificações, alterando as suas propriedades e funções (Wolburg et al. 2003).

As características das barreiras do SNC são moduladas e reguladas, tanto fisiologicamente como em consequência de uma patologia (Abbott et al. 2006). No caso do glioblastoma multiforme, por exemplo, foi demonstrado que existe perda da integridade e funcionalidade da BBB e ocorre a subexpressão da proteína claudina-3 das TJs, relacionadas com a regulação da difusão e resistência elétrica da barreira, entre outras alterações (Wolburg et al. 2003). Contudo, a barreira hematoencefálica apresenta vários mecanismos de entrada de moléculas para o cérebro, como será referido de seguida.

5.1. Mecanismos de transporte de moléculas através da BBB

Com base no peso molecular da substância que pretende atravessar a barreira hematoencefálica, existem vários mecanismos de transporte (Figura 4).

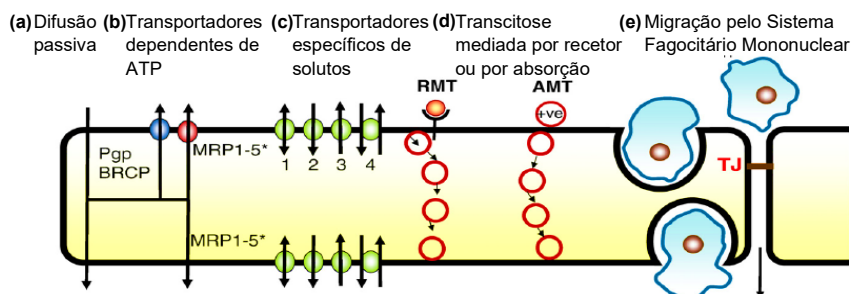


Figura 4 - Mecanismos de transporte de moléculas através da barreira hematoencefálica (adaptado de Abbott et al. 2010).

Uma ampla variedade de moléculas solúveis em lípidos é transportada através da BBB por difusão passiva (Liu et al. 2004). As moléculas com cargas positivas apresentam vantagem pela sua natureza catiónica, ligando-se às cargas negativas do glicocálice e da extremidade dos fosfolípidos (Abbott et al. 2010). Porém existem fatores que restringem esta passagem, como a superfície molecular com elevada polaridade, a tendência para formar cadeias com mais de 6 ligações de hidrogénio, o peso molecular superior a 450 kDa (kilodalton), e as cadeias rotativas da molécula (Clark 2003; Gleeson 2008).

Os transportadores dependentes de ATP, são bombas ativas de efluxo, que são responsáveis por proteger o SNC de neurotóxicos endógenos e de xenobióticos,

removendo-os do microambiente cerebral (Dallas et al. 2006). Na BBB as principais bombas de efluxo são a glicoproteína-P, as proteínas associadas à resistência a múltiplos fármacos e as proteínas associadas à resistência do cancro da mama (Begley 2004).

A maioria dos nutrientes essenciais polares, como a glucose ou aminoácidos, não passam por difusão passiva através da BBB. Assim, os transportadores específicos de solutos deixam estas moléculas atravessá-la seletivamente, tendo como objetivo a nutrição do SNC ou a remoção das mesmas quando em excesso (Zhang et al. 2002).

O transporte de macromoléculas como proteínas e péptidos é feito por endocitose. Estes mecanismos vesiculares incluem transcitose mediada por receptor (RMT) ou transcitose por absorção (AMT). No caso da RMT, o ligando da macromolécula estabelece uma conexão com recetores específicos que se encontram na superfície da célula, desencadeando a sua endocitose. A AMT requer um excesso de carga positiva da molécula, capaz de induzir a sua endocitose (Sauer et al. 2005).

Por fim, em casos de trauma ou isquémia cerebral, é ativado o sistema fagocitário mononuclear. Por diapedese, células como os leucócitos, macrófagos e monócitos, atravessam a BBB, de modo a proteger o SNC (Abbott et al. 2010).

5.2. Mecanismos de resistência da BBB aos fármacos

Apesar de todos estes mecanismos de transporte de moléculas através da BBB, a terapêutica dirigida ao SNC representa um grande desafio. A barreira hematoencefálica, devido aos seus mecanismos próprios de transporte de moléculas, apresenta alguma resistência à entrada dos fármacos para o microambiente cerebral. Apenas fármacos com peso molecular inferior a 450 kDa conseguem atravessar a BBB por difusão passiva (Pardridge 2002a), correspondendo a 2% dos fármacos existentes (Pardridge 2005). Os fármacos que conseguem atravessar a BBB são, na sua maioria, removidos imediatamente para o espaço extracelular, devido à presença das bombas de efluxo (Tsuji and Tamai 1999; Pardridge 2002). Além disto, após a entrada no espaço intracelular, os fármacos são sujeitos a uma elevada taxa de degradação metabólica, sendo responsável pela sua inativação farmacológica (Gherssi-Egea et al. 1988; Minn et al. 1991).

5.3. Targeting para a BBB

Apesar da grande promessa que as nanopartículas apresentam como transportadores de fármacos para o cérebro, estas podem acumular-se desnecessariamente nas células cerebrais e causar efeitos neurotóxicos (Shanker-Sharma and Sharma 2012). Deste modo, é importante produzir nanopartículas com reduzida ativação da microglia -

células responsáveis pela resposta inflamatória no SNC (Xue et al. 2012) – de modo a diminuir estes efeitos nocivos (von Roemeling et al. 2017). A utilização de nanopartículas com PEG, torna esta abordagem mais estável e inerte (Lila and Ishida 2017).

Como referido anteriormente, ao conjugar nanopartículas com moléculas de direcionamento ativo (Lai et al. 2013), o transporte dos fármacos através da barreira é facilitado. Esta metodologia apresenta as vantagens seguintes: as partículas tornam-se potencialmente mais lipofílicas, ocorre um aumento da estabilidade da nanopartícula, o fármaco é direcionado para um recetor específico e ocorre o desencadeamento da transcitose mediada por receptor (RTM) (Jones and Shusta 2007; Liu and Lu 2012; Kulkarni et al. 2016). O tamanho da nanopartícula e a sua polaridade são condições essenciais para o sucesso do seu transporte através da BBB (Shilo et al. 2015). Os recetores mais estudados para o *targeting* das células endoteliais da BBB são o da transferrina, lactoferrina e do folato (Ulbrich et al. 2009; Fernandez and Torres-Alemán 2012; Lajoie and Shusta 2015). Porém, estes apresentam a grande desvantagem de ocorrer competição entre as moléculas fisiológicas e os lipossomas.

O *dual targeting* poderá também ser utilizado no sentido em que um ligando se destina à barreira hematoencefálica e o outro se destina ao tumor. Para além do estudo de Loureiro et al. (2015) já referido, também no estudo de Ying et al. (2010) se desenvolveram lipossomas conjugados com *p-aminophenyl- α -d-mannopyranoside* (MAN) e transferrina. Os autores deste estudo concluíram que esta estratégia aumentava significativamente o transporte da daunomicina encapsulada em lipossoma através da BBB em modelos *in vitro* e *in vivo*.

No caso da BBB, o anticorpo é o ligando que mais tem sido estudado recentemente. Este apresenta bons resultados no transporte de fármacos através da barreira, sendo utilizado na terapêutica inflamatória e oncológica (Abbott et al. 2010). O anticorpo apresenta a vantagem de não interferir com o aporte de substâncias fisiológicas necessárias para o metabolismo da BBB e do SNC.

5.3.1. Anticorpos de domínio único – FC5 e G3

Os anticorpos de domínio único - *single-domain antibodies* (sdAbs) - são constituídos pelo fragmento VH da cadeia pesada dos anticorpos IgGs (Farrington et al. 2014; Muyldermans 2001; Tanha et al. 2002). No caso específico do anticorpo FC5, este é constituído pela cadeia VHH de camélídeo, visto que, esta espécie apresenta apenas um domínio na região variável (Figura 5). Os sdAbs apresentam várias vantagens em relação ao anticorpo convencional: o seu pequeno tamanho, a sua baixa imunogenicidade, a sua estabilidade em relação ao pH e temperatura (Muyldermans 2001), o fato de não serem

repostos para o meio extracelular pelas bombas de efluxo mediadas pelo recetor Fc e por apresentarem resistência notável às proteases (Zhang and Pardridge 2001; Schlachetzki et al. 2002). Devido ao seu pequeno tamanho, reconhecem antígenos que não conseguem ser reconhecidos pelos anticorpos comuns, os IgGs (Muyldermans 2001; J. Zhang et al. 2004). Além disto, os sdAbs são de fácil manuseamento e expressão, tornando-os adequados à produção de anticorpos bi-específicos (Willuda et al. 2001). Todas as características citadas anteriormente são desejáveis para desenvolver vetores de transporte de moléculas através da BBB, apresentando inúmeras vantagens face aos anticorpos convencionais (Abulrob et al. 2005).

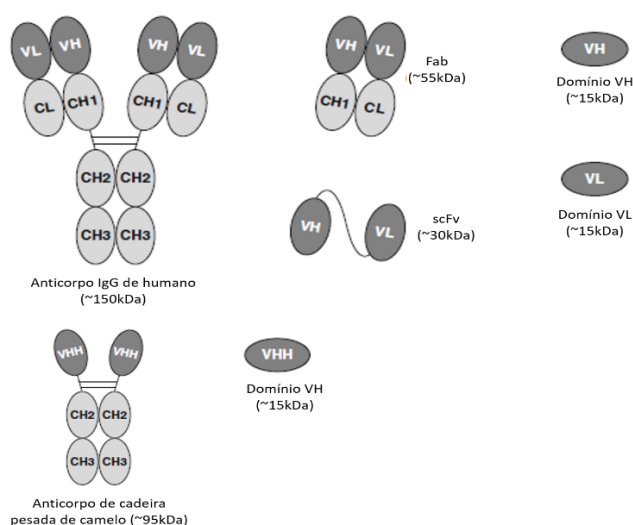


Figura 5 – Representação esquemática de anticorpos com interesse biotecnológico e clínico, de humanos e camelos (adaptado de Aires da Silva et al. 2008).

O FC5 é um novo anticorpo de domínio único, que apresenta grande seletividade para se ligar às células endoteliais do cérebro e migrar através da BBB em modelos *in vitro* e *in vivo* (Muruganandam et al. 2002; Tanha et al. 2003). O FC5 é transportado através da barreira por vesículas de transcitose, desencadeadas pelo seu reconhecimento através de epítomos antigénicos expressos na superfície celular. No estudo de Farrington et al. (2014), o FC5 foi projetado como uma fusão mono e bivalente com o domínio Fc humano, de forma a otimizá-lo como plataforma de entrega de moléculas ao cérebro. O estudo *in vitro* demonstrou que a fusão bivalente do FC5 com Fc aumentou a taxa de transcitose através da BBB em 25%, comparativamente à monovalente.

Além do FC5, no âmbito do projeto BBB-BIO/0508/2014 financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) o nosso grupo selecionou recentemente, a partir de uma biblioteca de anticorpos de coelhos imunizados com células da BBB e posteriormente selecionado pela tecnologia *phage display*, o anticorpo G3, no formato sdAb que apresentou propriedades muito promissoras para atravessar a BBB (Aires da Silva et al. 2017).

Estes sdAbs têm sido desenvolvidos com o objetivo de conjugá-los com produtos biológicos e transformá-los em transportadores através da barreira hematoencefálica, entre outras utilizações (Zhang et al. 2004; Abulrob et al. 2005).

5.4. Modelo BBB com células de glioblastoma humano (U87)

Devido à pouca permeabilidade da barreira hematoencefálica, a indústria farmacêutica tem vindo a procurar um modelo *in vitro*, que preserve as suas funções fisiológicas e de transporte de fármacos para o SNC (Pardridge 2001; Pardridge 2002b). Alguns sistemas de cultura de células foram estabelecidos como modelo *in vitro* da BBB, existindo atualmente muitos estudos com várias linhas celulares, tanto de origem humana como de bovino e de murganho (Garberg et al. 2005). Com estes modelos poderá ser possível estimar a permeabilidade através do cálculo da integridade da barreira e revelar alguns mecanismos moleculares da BBB. As células utilizadas para estes modelos são imortalizadas (Terasaki et al. 2003), sendo capazes de proliferar em cultura e se manter indefinidamente, estando os mecanismos de morte celular desativados (Irfan Maqsood et al. 2013).

Porém, estes modelos com células em cultura não conseguem mimetizar totalmente as condições *in vivo*, havendo uma diminuição das funções de transporte por subexpressão de alguns transportadores, diferenciando a permeabilidade do modelo em relação ao *in vivo* (Pardridge et al. 1990; Pardridge 1999).

Dos vários tipos de modelos destacam-se aqueles em que incluem apenas culturas de células endoteliais, os que incluem em co-cultura células endoteliais e astrócitos, e ainda, os que incluem para além destes dois últimos tipos celulares os pericitos (Deli et al. 2005). Recentemente foi descrito a utilização de células estaminais pluripotentes de origem humana (Lippmann et al. 2012).

As células apresentam um crescimento diferente dependendo da superfície em que são colocadas. Classicamente é utilizado o plástico como superfície de escolha (Tilling et al. 1998).

Em 2018 foi realizado por Li et al. (2018) um estudo em que foi construído um modelo *in vitro* da BBB. Como fármaco foi utilizado o paclitaxel encapsulado em lipossomas com PEG que apresentavam na sua superfície dois ligandos – o ácido fólico e o dNP2- de forma a realizar o direcionamento ativo tanto para o modelo da barreira como para as células de glioma. Para o modelo foi utilizada a linha celular bEnd.3 de células endoteliais cerebrais de murganho, realizando a sua cultura em *inserts*, que permitem o cultivo destas células em monocamada de modo a simular a BBB e permitir avaliar a passagem dos

fármacos. Posteriormente foram realizados ensaios de citotoxicidade na linha celular C6 de glioma de rato. Observaram-se bons resultados a nível da utilização da linhagem bEnd.3 para o modelo da BBB, verificando-se que os lipossomas com estes ligandos apresentam vantagens quer no transporte do fármaco através da barreira, quer na sua ação nas células de glioma. O estudo citado apresenta algumas semelhanças em relação ao proposto por esta dissertação.

6. Oncologia comparada

Tendo por base as consequências inerentes às relações entre animais e o Homem no mesmo ambiente, o conceito *One Health* promove uma inter-relação estreita entre Medicina Humana e Medicina Veterinária. Este conceito defende que um estudo comparativo entre espécies diferentes pode-nos ajudar a compreender a fisiologia de muitas doenças, zoonóticas ou que apresentem semelhanças entre espécies, bem como nos dá a oportunidade de apostar na sua prevenção (King et al. 2008; Ryu et al. 2017). Os modelos animais são úteis para aumentar a nossa compreensão sobre a biologia e o tratamento do cancro canino e humano (Gardner et al. 2016).

6.1. O cão e o rato como modelos animais

No âmbito da área da investigação oncológica existem vários modelos animais experimentais *in vivo*, sendo frequentemente usado o murganho. Existem três principais tipos de modelos experimentais em murganhos: modelos humanizados, de xenotransplante e geneticamente modificados. Já o modelo mais utilizado é o de xenotransplante, em que são injetadas células neoplásicas humanas no animal imunodeficiente. O modelo humanizado baseia-se na tentativa de reconstituir o sistema imunitário do murganho com células do sistema imunitário humano. Por fim, o modelo geneticamente modificado permite a expressão de oncogenes ou a inativação de genes supressores num tecido (Budhu et al. 2014). Estes modelos apresentam algumas limitações, sendo necessário um conhecimento comparativo da anatomia, fisiologia e farmacologia (Sundberg and Schofield 2009).

Um aumento do número de cães diagnosticados com cancro nos últimos anos tem chamado à atenção desta espécie como um possível modelo translacional (Gardner et al. 2016). Muitos autores têm realçado a importância da medicina comparativa com o cão, visto que este partilha intimamente o mesmo ambiente e é portador dos mesmos tipos de neoplasias que o Homem (Prier and Brodey 1963; Kaplan 1964). Para além disso, os detentores de cães encontram-se motivados em encontrar novas opções de tratamento para os tumores cerebrais dos seus animais de estimação, estando interessados em participar em ensaios clínicos quando os tratamentos convencionais falham.

Comparativamente aos murganhos, os cães apresentam o sistema imunitário intato. O genoma canino apresenta evidências de similaridade com o do Homem, particularmente os genes associados às neoplasias, encontrando-se mais semelhanças do que entre o Homem e o murganho (O'Brien and Murphy 2003; Lindblad-Toh et al. 2005; Paoloni and Khanna 2008). Além disso, o cão apresenta maior longevidade em relação ao murganho, podendo ser suficiente para o estudo dos fatores de desenvolvimento de doenças a longo prazo ou de efeitos secundários à terapêutica. Muitos dos tumores cerebrais caninos que ocorrem naturalmente exibem as mesmas características patológicas, moleculares e citogenéticas, assim como características semelhantes de neuroimagem com os do Homem (Lipsitz et al. 2003; Stoica et al. 2004; Thomson et al. 2005; Dickinson et al. 2008; Sturges et al. 2008). Estes fatores contribuem para a utilização de cães como modelos animais pré-clínicos, para o benefício mútuo da Medicina Humana e Medicina Veterinária (Gardner et al. 2016).

CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE LIPOSSOMAS PARA TRANSPORTE DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA BBB PARA O CÉREBRO

1. OBJETIVOS

A nível global os tumores cerebrais apresentam uma elevada morbilidade e mortalidade. A principal dificuldade no tratamento dos tumores cerebrais é o fato de os fármacos apresentarem grande dificuldade em atravessar a barreira hematoencefálica (BBB). Após a descoberta da estrutura das células neoplásicas e da BBB, muitas abordagens para o tratamento oncológico têm sido desenvolvidas no sentido de direcionar as moléculas terapêuticas através de mecanismos fisiológicos.

Sendo assim, o objetivo principal desta dissertação de mestrado foi contribuir para o desenvolvimento de um imunolipossoma com duplo direcionamento ativo para o tratamento de tumores cerebrais. Para isto, foi realizada a otimização do lipossoma para a encapsulação de fármacos citotóxicos de elevada atividade, como o panobinostat, um iHDAC. De forma a aumentar o “*targeting*” e a eficácia do lipossoma testou-se uma molécula - o folato - com potencial para o direcionamento ativo para os tumores cerebrais. A sua expressão foi testada em linhas celulares de tumores cerebrais primários (U87 – glioblastoma humano) e secundários (MCF7 – adenocarcinoma mamário humano). Posteriormente, desenvolveram-se lipossomas com panobinostat encapsulado, com PEG e com ou sem folatos na sua superfície, tendo-se realizado a avaliação da sua citotoxicidade, nas mesmas linhas de tumores cerebrais. Por fim, foram desenvolvidos imunolipossomas através da ligação de anticorpos de domínio único, capazes de transmigrar a BBB - FC5 e G3, na sua superfície. Foram realizados estudos de translocação utilizando o modelo da BBB *in vitro*, com o objetivo de comprovar a eficiência do imunolipossoma em atingir e atravessar a BBB. Além disso, foi proposta uma otimização ao modelo convencional da BBB - modelo BBB + U87 *in vitro* - testando-se o panobinostat tanto na sua eficiência de passagem através da BBB como na citotoxicidade na linha de tumor cerebral primária.

Como apresentado na Figura 6, o trabalho laboratorial realizou-se, então, em quatro fases: a deteção da expressão dos folatos nas linhas celulares U87, MCF7 e bEnd.3 através de uma análise de *SDS-PAGE* e *Western Blot*; a avaliação da ação do iHDAC na sua formulação livre, lipossomal e lipossomal com PEG-folato, nas mesmas linhas celulares, através de ensaios de citotoxicidade; a realização do modelo *in vitro* da BBB, testando-se a desintegração da BBB e a eficiência de passagem dos anticorpos, lipossomas e imunolipossomas através da mesma; e, a realização dos primeiros ensaios de otimização do modelo *in vitro* proposto, testando se o iHDAC na sua formulação livre atravessa a BBB e é capaz de diminuir a viabilidade celular da linha U87.

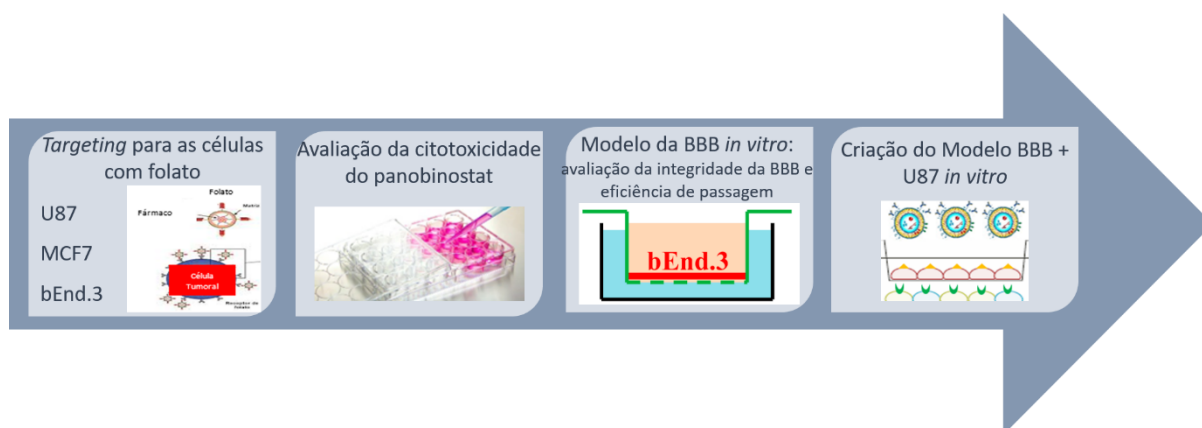


Figura 6 - Representação esquemática das fases do desenho experimental (original da autora).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Linhas celulares

As linhas celulares imortalizadas utilizadas foram a U87 de glioblastoma humano (U-87 MG ATCC® HTB-14™), a MCF7 de adenocarcinoma mamário (MCF7 ATCC® HTB-22™) e a bEnd.3 de células endoteliais de capilares cerebrais de murganho (bEnd.3 [BEND3] ATCC® CRL-2299™), adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC). Todas estas linhas celulares são aderentes, sendo que foram mantidas em cultura na estufa em ambiente húmido à temperatura de 37 graus Celsius (°C) e 5% de dióxido de carbono (CO₂), em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco - Waltham, Massachussets) suplementado com 10% de soro fetal de bovino previamente inativado pelo calor (FBS- *Fetal Bovine Serum*) (Gibco), penicilina (100 Unidades/mililitro – U/mL), estreptomicina (0,1 miligramas/mililitro - mg/mL) e anfotericina B (0,25 microgramas/mililitro - µg/mL) (Gibco) em frascos de cultura T75 de poliestireno (Greiner Bio-One - Kremsmünster, Áustria).

2.1.1. Cultura e manipulação de células aderentes

As células aderentes apresentam formas heterogéneas dentro da mesma linha e aderem às superfícies. Na sua cultura, o frasco encontra-se na horizontal de modo que estas adiram à sua parede. Aquando do seu transporte o frasco é posicionado na vertical, observando a opacidade da parede do frasco causada pela aderência das células e a opacidade e cor do meio, sendo necessário mudá-lo regularmente.

A passagem das células aderentes iniciou-se com a remoção do meio já metabolizado e com células mortas em suspensão. De seguida, realizou-se a lavagem do tapete celular com tampão de fosfato salino (PBS) para cultura celular (Biowest – Nuaille, França) de modo a remover restos de células mortas ou de FBS do meio anterior, que poderá inibir a ação da tripsina. Após a lavagem, foram colocados 1,5mL de tripsina a 0,25%, que ficam em contacto com as células na estufa por um período de 3 minutos, para que estas se destaquem da superfície do frasco. Após este período, adicionou-se 5mL de meio aquecido à temperatura ambiente, de modo a diluir e inativar a tripsina. Transferiam-se as células para um tubo de centrifugação de base cónica de 15 mL, para serem centrifugadas a 400g (força gravitacional) durante 5 minutos. Seguidamente retirou-se o sobrenadante ficando o *pellet* de células no fundo do tubo, adicionaram-se cerca de 10 mL de meio de cultura de forma a separar os aglomerados de células do *pellet*. Antes de prosseguir com o armazenamento das células, foi necessário avaliar a sua viabilidade celular. Assim, foi realizado o teste Azul de *Trypan*, em que se adiciona 10 microlitros (µL) do volume total de células a 90 µL do reagente *Trypan Blue*, que cora as células mortas de azul. A mistura é colocada num hemocítmetro (câmara de *Neubauer*), procedendo-se

seguidamente à contagem celular ao microscópio. De acordo com o valor obtido, colocou-se o volume necessário de células num frasco T75 esterilizado e adicionou-se meio de cultura novo à temperatura ambiente, até perfazer um volume total de 10 mL. Por fim, colocou-se na estufa sob as condições previamente mencionadas.

2.2. Fármacos

2.2.1. Fármacos citotóxicos

O fármaco utilizado foi o iHDAC – panobinostat, adquirido da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, Cat #EPI009), com o qual se realizaram soluções na concentração de 5 mg/mL, em dimetilsulfóxido (DMSO) e crioconservadas a -20°C.

2.2.2. Encapsulação dos fármacos citotóxicos em lipossomas

O panobinostat foi encapsulado em lipossomas. A formulação 1 apresenta o panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG e a formulação 2 o panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG e folatos (Tabela 5). Estes lipossomas foram desenvolvidos pela Doutora Maria Manuela Gaspar – investigadora auxiliar no departamento de Tecnologia Farmacêutica e Farmácia Galénica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa – em colaboração com o presente projeto.

Tabela 5 - Composição lipídica dos lipossomas (original da autora).

Fórmula	Composição lipídica (rácio molar)	Concentração lipídica ($\mu\text{mol/ml}$)	Tamanho médio (P.I.)	Zeta Pot (mV)
1	DPPC:Chol:DSPE-PEG (1.85:1:0.15)	34,9	110 \pm 1 (<0.050)	-3 \pm 1
2	DPPC:Chol:DSPE-PEG: DSPE-PEG-FA (1.85:1.0:0.12:0.03)	58,9	110 \pm 1 (<0.050)	-3 \pm 1

2.3. Identificação de moléculas de ligação para *Targeting*

2.3.1. Extração da proteína

Após a lavagem, as células foram lisadas com 100 μL de tampão de ensaio de imunoprecipitação por rádio (RIPA *buffer*) (25 mM TrisHCL pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sódio, 0,1 % SDS) suplementado com *cocktail* de protease inibidora (Roche), para extração da proteína total. Foi incubada em gelo durante 30 minutos. De seguida, centrifugou-se a solução a 13200rpm durante 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante recolhido foi conservado a -20°C.

2.3.2. Quantificação do extrato de proteína

Para a quantificação do extrato de proteína utilizou-se o método de *Bradford* (Walker and Kruger 2002), sendo este um método colorimétrico, classificado como rápido e preciso (Kruger 1994). A concentração proteica das amostras é estimada realizando uma curva padrão da medição da absorvância de várias diluições padrão da BSA comparativamente à sua concentração em $\mu\text{g} / \text{mL}$. A equação, que descreve a curva padrão, foi usada para determinar a concentração de proteína em amostras desconhecidas.

Para determinar a concentração de proteína na nossa amostra, foram adicionados 2 μL de amostra ao reagente *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (*Bio-Rad* - Hercules, Califórnia, USA) previamente diluído de 1:10 (em PBS) e incubou-se por 5 minutos ao abrigo da luz. A absorvância foi lida no espectrofotômetro *FLUOstar OPTIMA* (*BMG LABTECH*) a uma excitação de 600 nm e emissão de 620 nm, sendo obtidas as concentrações de cada amostra, após extrapolação na curva de calibração.

2.3.3. Preparação das amostras

A quantidade de amostra necessária foi calculada de forma a obtermos as concentrações pré-determinadas (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a esta adicionou-se 5 μL de 4x *Laemmli Sample Buffer* (LB) (*Bio-Rad*) e perfizemos com PBS até atingirmos o volume pretendido (20 μL). As amostras foram aquecidas em banho seco a 100°C durante 10 minutos.

2.3.4. SDS-PAGE

Para a separação do extrato de proteína total foi realizado um SDS-PAGE (eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida). Para tal, foi preparado um gel a 15% para a separação das proteínas, apresentado 10 poços. Os 8 poços do gel foram carregados com 20 μL das amostras anteriormente preparadas. Nos restantes 2 poços foram colocados 5 μL de marcador de proteína (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa). O gel foi corrido a 160Volts (V) durante cerca de uma hora.

2.3.5. Western Blot

A transferência da proteína para membrana de nitrocelulose foi realizada em gelo, a cerca de 4°C durante aproximadamente uma hora a 250 miliamperes (mA). Após a transferência as membranas foram bloqueadas com leite a 5% (10 mL de PBS 1x/Tween 20 0,20% com 0,5 g de leite em pó) durante uma hora. Foram lavadas uma vez com PBS/Tween 20 (0,20%) e colocadas neste *overnight* a 4°C. Depois foram lavadas uma vez com PBS/Tween 20 (0,20%) e incubadas com os respetivos anticorpos primários: anti-

receptor do folato (anticorpo policlonal de coelho na diluição de 1:500 com 1% de leite, ThermoFisher) e anti-tubulina (anticorpo monoclonal de rato na diluição de 1:1250 com 1% de leite, Sigma) durante uma hora à temperatura ambiente. De seguida, as membranas foram lavadas três vezes com PBS/Tween 20 (0,20%). Posteriormente foram incubadas com os respetivos anticorpos secundários: anti-IgG de coelho (anticorpo policlonal de cabra na diluição de 1:2000 com 1% de leite, ref. 111-035-045, abcam) e anti-IgG de rato (anticorpo policlonal de ovelha na diluição de 1:7500 com 1% de leite, ref. 515-035-062, abcam), durante uma hora à temperatura ambiente. As membranas foram ainda lavadas três vezes com PBS/Tween 20 (0,20%), e por fim, foram reveladas por quimioluminescência com *Luminata Forte Western HRP (Merck Milipore)* no *ChemiDoc XRS* e sistema de imagem (*Bio-Rad*) durante 40 minutos.

2.4. Ensaios de Citotoxicidade

2.4.1. Ensaio de citotoxicidade de células aderentes U87

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados na linha celular U87, de glioblastoma humano, que tiveram como objetivo observar os efeitos citotóxicos do panobinostat livre, da formulação lipossomal do panobinostat com PEG e da formulação lipossomal do panobinostat com PEG-folato.

A avaliação da viabilidade celular realizou-se pelo teste do Azul de *Trypan* no hemocítometro. Contaram-se as células que não coraram, ou seja, as células vivas. Para um valor superior a 90%, as células foram plaqueadas numa placa de 96 poços com cerca de 5×10^3 células por poço. Esta concentração celular havia sido otimizada em trabalhos anteriores do grupo (Rico 2018). As células foram diluídas em 200 μ L de meio DMEM e colocadas em cada poço, e incubadas durante 24h em estufa de CO₂, a 37°C.

Vinte e quatro horas depois o meio foi retirado e colocadas diluições, em duplicado, das formulações do iHDAC - segundo um gradiente de concentrações crescente entre 0.048 μ M e 100 μ M com uma diluição de 1:2 - de panobinostat livre, da formulação lipossomal do panobinostat com PEG e da formulação lipossomal do panobinostat com PEG-folato. Além disso considerou-se um controlo, em duplicado, tratado apenas com o veículo – meio DMEM completo. As placas foram incubadas durante 72h na estufa de CO₂ a 37°C.

Para avaliação da viabilidade e proliferação celular, colocaram-se 10 μ L do reagente de proliferação celular WST-1 (Roche) e procedeu-se à incubação durante 24h na estufa de CO₂ a 37°C. O princípio do WST-1 baseia-se na clivagem do sal de tetrazólio em formazano pelas desidrogenases mitocondriais das células, ou seja, quanto mais células

metabolicamente ativas, que não foram inibidas pelo tratamento farmacológico, maior a quantidade de formazano formado (Peskin and Winterbourn 2017). Por fim, avaliou-se a absorvência a 450nm e calculou-se a viabilidade celular para cada poço (Figura 7).

Com os resultados obtidos foi possível calcular a concentração inibitória de 50% da população celular (IC50) para esta linha, e assim avaliar a citotoxicidade induzida. Tanto para os gráficos como para o cálculo do IC50 foi utilizado o programa *GraphPad Prism 8*, versão 8.3.0 (2019).

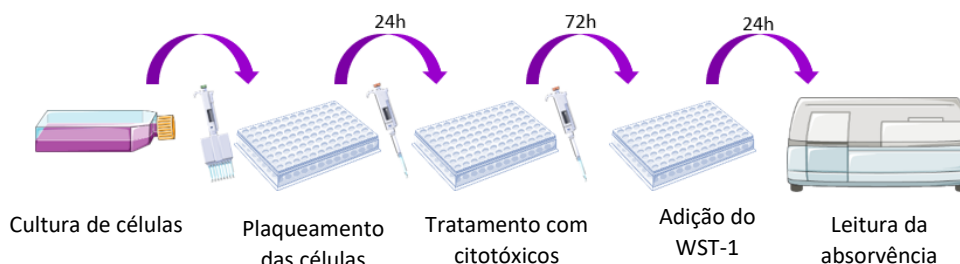


Figura 7 - Esquema representativo dos ensaios de citotoxicidade realizados (original da autora).

2.4.2. Ensaio de citotoxicidade de células aderentes MCF7 – otimização do protocolo

No caso da linha celular MCF7 de adenocarcinoma mamário, devido a existir informação diversa, foi realizada uma otimização do protocolo em relação à densidade celular a utilizar. Foram realizados 4 ensaios com diferentes concentrações celulares: 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 e 4×10^4 células por poço. As células foram diluídas em meio DMEM completo, colocando 200µL em cada poço. Posteriormente foi realizado o protocolo descrito anteriormente.

2.4.3. Ensaio de citotoxicidade de células aderentes bEnd.3 – otimização do protocolo

No caso da linha celular bEnd.3 de células endoteliais de capilares cerebrais de rato, foi realizada uma otimização do protocolo em relação ao tempo de tratamento, com o objetivo de perceber quanto tempo os citotóxicos poderiam estar em contacto com as células da barreira sem as danificar. Foram então realizados 4 ensaios com a concentração celular de 1×10^4 células por poço, mas com diferentes tempos de exposição: 90 minutos, 3 horas, 6 horas e 24 horas. Ao fim de cada ponto temporal, foi retirado o meio com os citotóxicos e foi colocado novo meio (10 µL de WST-1) em cada poço. O restante protocolo foi realizado como descrito anteriormente.

2.5. Modelo BBB

2.5.1. Otimização do protocolo

Com o objetivo de construir um modelo *in vitro* da BBB com células tumorais, foi necessário otimizar o número de células da linha U87 para cada poço de uma placa de 24 poços (P24), sendo esta a usada no ensaio da BBB. Considerando que a área do fundo do poço de uma placa de 96 poços é de 0,32 cm² e são utilizadas 5x10³ células em cada poço, a área do fundo do poço de uma placa de 24 poços é de 1,9cm², utilizou-se o número de células proporcional à área do poço, tendo sido testada a concentração de 3x10⁴ células por poço. Esta concentração celular foi testada com 4 concentrações de panobinostat livre: 25 µM; 6,25 µM; 0,19 µM; e, 0,048 µM. Como controlo foram utilizadas as células tratadas com o veículo de solubilização do panobinostat.

Além disso, foi realizada a otimização descrita anteriormente, em relação ao tempo de tratamento com iHDAC, na linha celular bEnd.3. Estas otimizações foram necessárias de modo a obtermos um ensaio como o esquematizado na Figura 8.

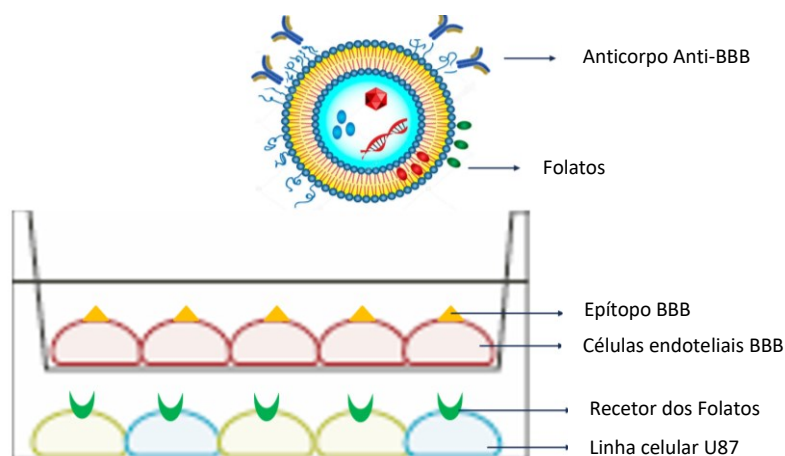


Figura 8 - Esquematização do modelo proposto para avaliação da passagem dos lipossomas através da BBB e citotoxicidade nas U87 (original da autora).

2.5.2. Preparação do ensaio da BBB

O modelo *in vitro* da BBB foi realizado numa placa de 24 poços (P24), com a colocação de *inserts* (3 µm Transwell® inserts - Corning, USA) nos poços. Inicialmente preparou-se a fibronectina na concentração de 1 mg/mL e adicionaram-se 1,5 µL a 4,5 mL de meio DMEM completo, e incubada nos *inserts* durante 1 hora, a 37°C na estufa com 5% de CO₂.

O protocolo de destacamento das células do frasco T75 é igual ao anteriormente descrito. Foram colocadas 4×10^3 células endoteliais dos capilares cerebrais de rato - bEnd.3 - no ápice (*insert*). Os *inserts* apresentam perfurações na sua base de forma a que as células consigam aderir, mas permitindo a passagem de substâncias através deste para o poço da P24. De seguida, colocaram-se 200 μ L de meio DMEM completo com as células no ápice e 500 μ L de meio na base do poço da P24, e incubou-se na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os meios foram trocados regularmente até que as células apresentassem uma confluência satisfatória. Em média, estipulou-se que o crescimento celular ocorreu entre 11 e 13 dias, até as células apresentarem uma confluência tal que permitam a passagem difusamente de apenas 5% das moléculas, o que corresponde a 95% de integridade da barreira formada.

2.5.3. Avaliação da integridade da barreira celular

Após o período de crescimento celular, realizou-se a avaliação da integridade da barreira formada pelas células, de modo a verificar se a integridade desta era superior a 95%. Essa avaliação realizou-se no início do ensaio, escolhendo-se dois *inserts* aleatoriamente de forma a verificar se estes apresentavam a integridade mínima necessária. No final do ensaio da BBB foi realizada nova avaliação, de forma a observar se os fármacos a que esteve exposta a danificaram, o que diminuiria a sua integridade.

Em primeiro lugar, preparou-se o Tampão de Transporte (TB) (Glucose 1M, MgCl₂ 1M, Hepes 1M, BSA 3% e PBS a 1%). De seguida, o FD40, um dextrano fluorescente com peso molecular 40 kDa que passa difusamente através da BBB, foi diluído em TB, de modo a obter-se uma absorvência inferior a 0,1.

Obtendo este valor de absorvência, transferiram-se os *inserts* para uma nova placa e lavou-se o ápice e a base uma vez com PBS estéril, e três vezes com TB. Adicionaram-se 200 μ L da solução anteriormente preparada de FD40 ao ápice e 500 μ L de TB à base, e incubou-se durante 2 horas na estufa, a 37°C e 5% de CO₂.

Após o período de incubação, recolheram-se as amostras do ápice e da base. Colocou-se num poço de uma placa preta 200 μ L do recolhido da base e misturou-se 80 μ L do recolhido do ápice com 120 μ L de TB noutro poço, realizando este procedimento para cada *insert*. Como controlo utilizaram-se 80 μ L da solução de FD40 com 120 μ L de TB. A leitura da fluorescência foi realizada a comprimentos de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm (FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH).

A quantificação da integridade foi obtida através do cálculo da proporção de FD40 que passou do ápice para a base, sendo que quanto mais FD40 passar, menos íntegra se encontra a barreira (Equação 1).

Equação 1 – Cálculo da % de integridade da BBB do ensaio *in vitro*.

$$\frac{\text{Fluorescência do ápice ou base (nm)}}{\text{Fluorescência do controlo (nm)}} \times 100 = \% \text{ de Integridade da BBB}$$

2.5.4. Ensaio da eficiência de passagem no modelo da BBB *in vitro*

Após a verificação da integridade inicial da barreira formada pelas células, foi realizado o ensaio da passagem das formulações através da barreira *in vitro*. O objetivo deste ensaio foi comparar a eficiência de passagem através da BBB do lipossoma e do lipossoma com vectorização ativa. Neste ensaio foram testados dois anticorpos como vectorização ativa – o FC5 e o G3. Como mencionado anteriormente, está provado que o anticorpo FC5 apresenta a capacidade de atravessar a BBB. O anticorpo G3 foi o selecionado de entre vários anticorpos como o mais eficaz em atravessar a barreira hematoencefálica, no âmbito do projeto financiado da FCT (PTDC/BBB-BIO/0508/2014) com o título “Ultrapassando o dilema da entrega de fármacos ao cérebro: Desenvolvimento de anticorpos de domínio único para direcionamento e entrega de drogas ao cérebro”.

O ensaio foi realizado segundo o esquema apresentado na Figura 9, sendo que cada formulação foi testada em duplicado. Foi apenas realizado um ensaio com este formato.

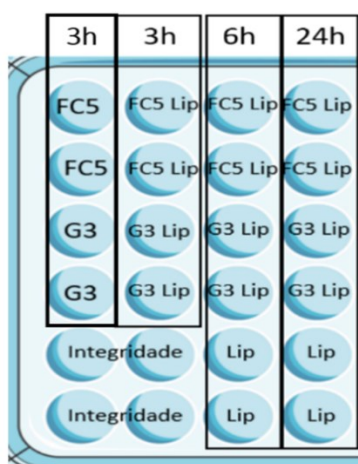


Figura 9 - Esquematização do ensaio realizado da BBB *in vitro* (original da autora).

As formulações testadas foram os anticorpos FC5 e G3 com tempo de exposição de 3 horas; anticorpos FC5 e G3 ligados ao lipossoma-PEG através da biotina (otimização realizada por Silva 2019), com tempo de exposição de 3, 6 e 24 horas; e o lipossoma-PEG com tempo de exposição de 6 e 24 horas. Com o objetivo de estudar as capacidades de transmigração dos lipossomas e imunolipossomas através da BBB, estes foram encapsulados com rodamina, uma proteína fluorescente, que permite posteriormente a leitura da fluorescência. Os imunolipossomas foram previamente diluídos em DMEM simples (sem vermelho de fenol).

Os *inserts* contendo as células foram lavados, uma vez com PBS e uma vez com DMEM simples. Adicionaram-se 200 µL da solução realizada com as formulações aos respectivos ápices e 500 µL de DMEM simples à base. Incubou-se consoante os tempos predefinidos, na estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao fim de cada tempo de exposição, retirou-se todo o volume do ápice e da base para tubos de ensaio, respetivamente identificados.

No fim de todas as recolhas, procedeu-se à quantificação da integridade da barreira de células, de modo a avaliar se os compostos colocados nos *inserts* a destruíram. Esta foi realizada como descrito anteriormente. Além disso, avaliou-se a eficiência de passagem das formulações testadas através do *insert*, que simula a barreira hematoencefálica. Realizou-se a leitura da fluorescência (FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH) das amostras retiradas do ápice e da base das formulações que continham lipossomas. A transmigração dos lipossomas foi calculada através da equação 1. Os procedimentos realizados encontram-se esquematizados na Figura 10.

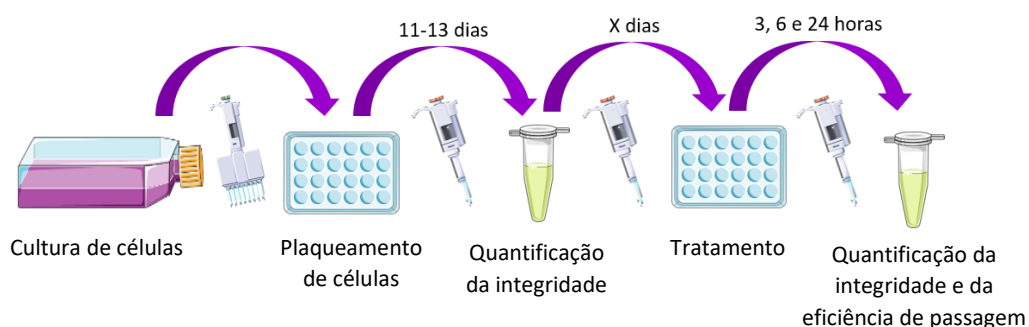


Figura 10 - Esquematização das etapas do ensaio realizado da BBB in vitro (original da autora).

2.5.5. Ensaio da eficiência de passagem no modelo BBB + U87 *in vitro*

Adicionalmente, foi realizado um primeiro teste do modelo da BBB com células tumorais da linha U87. Neste foi avaliado se o panobinostat livre conseguia ultrapassar a BBB e se conseguia diminuir a viabilidade das células U87 que foram colocadas na base do poço da P24. Para este ensaio foi escolhida a concentração 20 µM de panobinostat a colocar no ápice, com tempos de incubação de 6 e 24 horas. Foram também realizados controlos negativos e positivos para as células U87, sendo que neste caso não foram colocados *inserts* nos poços. No controlo negativo foi colocado apenas meio de cultura no poço da P24 e no controlo positivo foram colocados 20 µM de panobinostat livre, como esquematizado na Figura 11.



Figura 11 - Esquematisação do ensaio realizado da BBB + U87 *in vitro* (original da autora).

De seguida, procedeu-se como descrito anteriormente, tendo sido colocada uma solução de 20 μ M de panobinostat livre em DMEM completo no ápice e na base apenas DMEM completo. Neste ensaio foi utilizado DMEM completo em vez de DMEM simples, visto que após atravessar a barreira esta solução esteve em contato com as células U87, que necessitam de substratos constituintes do meio completo. Incubou-se durante 6 e 24 horas, na estufa a 37°C e 5% CO₂. Ao fim de cada *timepoint*, retirou-se o *insert* e deixou-se a solução que se encontrava na base atuar nas células U87 durante mais 48 horas.

Neste ensaio com o panobinostat livre, foi apenas medida a integridade da barreira, visto não existir lipossoma com ligação à rodamina.

2.5.5.1. Quantificação da viabilidade celular nas U87

Após o ensaio anteriormente descrito, foi realizada a quantificação da viabilidade celular das células U87, com o objetivo de perceber se o composto ao atravessar o *insert* apresentava efeito citotóxico nas células U87. Esta foi realizada tanto nos poços da P24 que continham anteriormente o *insert* com panobinostat livre no seu ápice como nos controlos negativos e positivos. A estes foi adicionado WST-1. Após a incubação de 24 horas, foram lidos os valores da absorvência de cada poço no espectrofotómetro de varrimento (SpectraMAX 340pc) a um comprimento de onda de 450nm, para posterior cálculo da viabilidade celular. Na Figura 12 encontram-se sucintamente esquematizados os procedimentos realizados.



Figura 12 - Esquemática do ensaio realizado da BBB + U87, especificando o passo da quantificação da viabilidade celular (original da autora).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da presença do recetor do folato nas linhas celulares – U87, MCF7 e bEnd.3

Para pesquisa da presença do recetor do folato nas células das linhas U87 de glioblastoma humano, MCF7 de adenocarcinoma mamário humano e bEnd.3 de células endoteliais cerebrais de rato foram realizadas as técnicas de SDS-PAGE/*Western Blot*. Utilizou-se as mesmas concentrações crescentes de extrato celular de cada linha. Foi utilizado o controlo positivo da tubulina, proteína globular presente em todas as células (Moritz 2017). Realizaram-se pelo menos três ensaios replicados, obtendo-se os mesmos resultados. Os resultados obtidos pela análise *Western Blot* (Figura 13) indicam que tanto as células de glioblastoma humano como as células de adenocarcinoma mamário humano apresentam o recetor dos folatos. Estes resultados apresentam-se em conformidade, visto que, quanto maior a concentração de extrato celular, maior a concentração de recetores de folato. Por outro lado, a linha celular bEnd.3 não apresenta recetor dos folatos, pelo menos nas mesmas concentrações das anteriores.

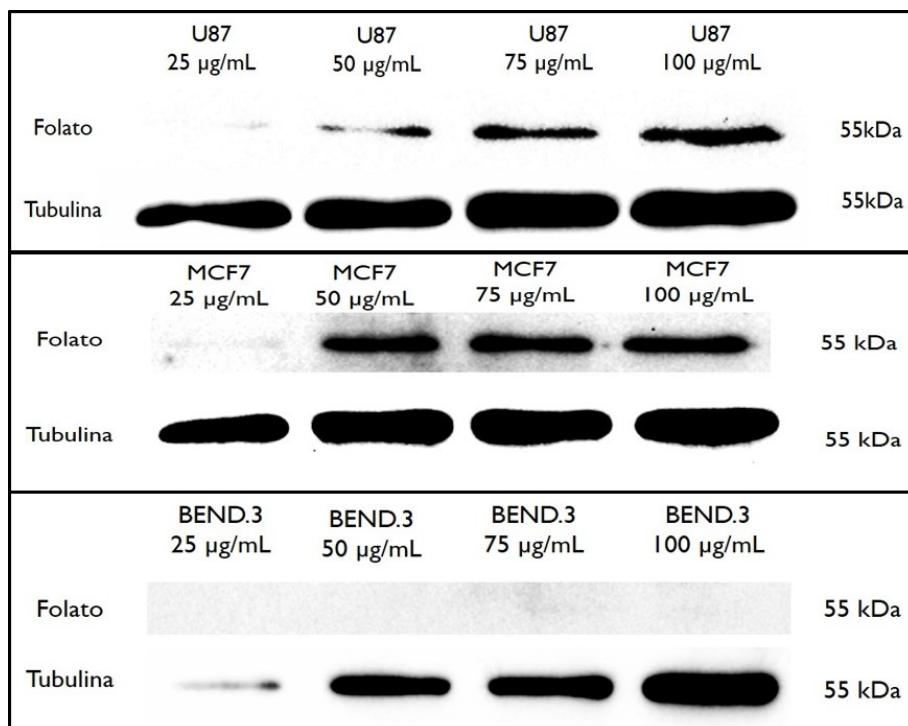


Figura 13 - Avaliação da presença de folato e tubulina nas linhas celulares U87, MCF7 e bEnd.3, por Western Blot.

Os resultados sugerem que o folato poderá ser utilizado como ligando de vectorização ativa em nanopartículas nestas linhas celulares de glioblastoma e adenocarcinoma mamário, visto apresentarem recetores para este. Poderão também indicar que os folatos utilizados para *targeting* das células neoplásicas, com principal importância no glioblastoma, não serão reconhecidos nas células da barreira hematoencefálica, não interagindo com esta nem lhe causando danos. Deste modo, procedeu-se ao desenvolvimento de lipossomas com e sem folato à superfície.

3.2. Seleção do fármaco e desenvolvimento de lipossomas – encapsulação do fármaco

As HDAC têm sido investigadas, havendo evidências da sua influência em estados de aberração epigenética que estão envolvidos no desenvolvimento de neoplasias (Bolden et al. 2006). Por isso, os iHDAC são um grupo de fármacos utilizado na terapêutica oncológica e o escolhido para este estudo.

Como o efeito biológico dos iHDAC está dependente da especificidade dos diferentes compostos para as diferentes enzimas HDAC e suas funções (Chun 2015: 201), com base no estudo de Dias et al. (2018), o fármaco selecionado como mais potente do grupo dos iHDAC foi o panobinostat. O passo seguinte consistiu em desenvolver lipossomas para a encapsulação deste fármaco.

3.3. Avaliação da atividade citotóxica dos fármacos

Após a escolha do fármaco livre e obtenção dos lipossomas procedeu-se então aos ensaios de citotoxicidade para avaliação dos seus efeitos nas respetivas linhas celulares.

3.3.1. Glioblastoma Humano

O glioblastoma é uma neoplasia cerebral que apresenta muitos desafios a nível da terapêutica e um prognóstico bastante reservado. A terapêutica convencional apresenta muitas desvantagens, existindo na sua maioria um grande nível de insucesso. Uma das principais razões, no caso da quimioterapia, é o fato da barreira hematoencefálica ser impermeável à maioria dos fármacos. Outro fator é a resistência das neoplasias aos citotóxicos, entre outros, havendo uma crescente necessidade de investigar novas e mais eficazes abordagens terapêuticas. Os lipossomas têm vindo a mostrar-se cada vez mais eficazes na diminuição da eliminação do fármaco e como sistema de entrega deste, mantendo atividade citotóxica. A escolha do quimioterápico para utilização nestes ensaios, teve por base o trabalho de Rico (2018), que num primeiro ensaio testou a doxorrubicina e o panobinostat nas suas formulações livres, na linha celular U87. Nesse ensaio, observou-se que o panobinostat apresentava maior efeito citotóxico em relação à doxorrubicina.

Assim sendo, os ensaios de citotoxicidade realizados neste estudo tiveram como objetivo avaliar se a atividade citotóxica do fármaco selecionado – o panobinostat – se mantém ou se é influenciada pela encapsulação em lipossoma e pela vectorização ativa dos lipossomas através do PEG-folato, na linha celular U87 de glioblastoma humano.

Foram utilizadas concentrações em gradiente decrescente entre 100 μM e 0,048 μM com uma diluição de 1:2 entre cada. Para cada formulação do fármaco foram realizados dois ensaios individuais com duplicados (Figura 14). Foi realizado um gráfico utilizando o programa *GraphPad Prism 8.3.0*, com desvio padrão da média dos dois ensaios realizados para cada formulação e um gráfico comparativo (Figura 15).



Figura 14 - Ensaio de citotoxicidade realizado na linha celular U87 de glioblastoma humano.

Legenda: Azul - células U87 tratadas com panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG-folato; Verde – células U87 tratadas com panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG; Vermelho – controlo negativo de células tratadas apenas com meio DMEM completo. Semelhante ao rodeado a azul ou verde foi realizado numa placa separada, em que as células U87 foram tratadas com panobinostat livre.

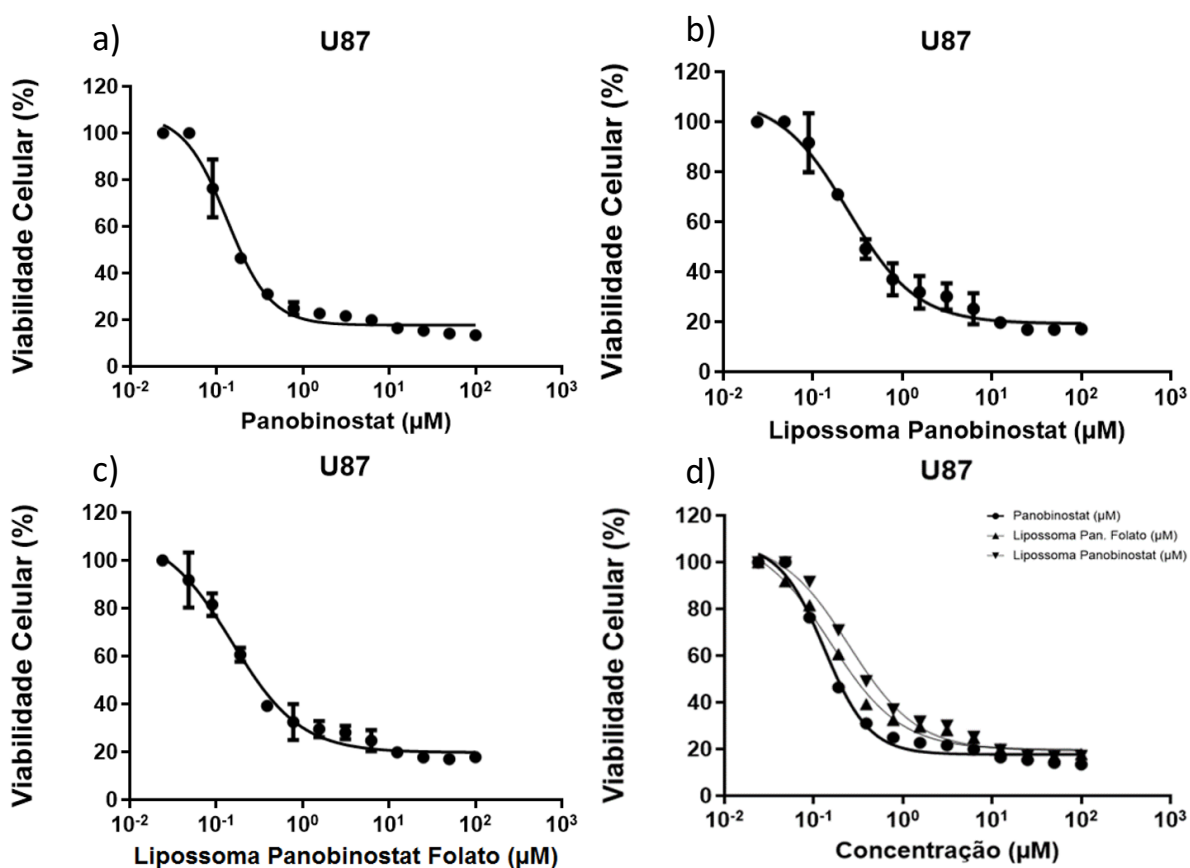


Figura 15 – Efeito citotóxico das formulações de panobinostat em U87.

Legenda: A figura apresenta três gráficos a), b) e c) da média da viabilidade celular da linha celular U87 para cada formulação de panobinostat contendo o desvio padrão. O gráfico d) compara as várias formulações de panobinostat, ficando visivelmente perceptível as diferenças dos efeitos citotóxicos destas, na linha celular U87.

Na Tabela 6, encontram-se os respectivos valores da média e desvio padrão do IC₅₀, obtidos para cada formulação testada nas U87.

Tabela 6 - Valores de IC₅₀ (μM) de cada formulação testada em U87.

Fármacos	IC₅₀ (μM)
Panobinostat livre	0,132 ± 0,045
Panobinostat Lipossoma	0,248 ± 0,074
Panobinostat Lip. Folato	0,153 ± 0,091

A análise estatística foi realizada de acordo com o representado no ANEXO I. Pelo teste de Shapiro-Wilk foi possível aferir que os valores de IC₅₀ seguem uma distribuição aproximadamente normal ($p=0,566$, $p>0,05$), com um nível de significância de 5%. Assim, existe evidência estatística de que não se rejeita a hipótese nula (H_0) (H_0 = os dados apresentam uma distribuição aproximadamente normal). Assim, foi aplicada uma ANOVA para análise da variância dos resultados. Para identificar as médias que diferem entre si, foi aplicado um teste de Tukey como complemento à ANOVA.

Analisando os gráficos da Figura 15 e a Tabela 6 observa-se que o valor médio do IC₅₀ do panobinostat livre é o mais baixo comparativamente às restantes formulações.

O valor de IC₅₀ do panobinostat livre observa-se ser inferior ao valor de IC₅₀ do panobinostat encapsulado em lipossoma-PEG com uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,030$). Este resultado sugere que o panobinostat livre é mais eficaz do que o encapsulado em lipossoma, porém os valores de IC₅₀ aproximam-se.

O valor de IC₅₀ do panobinostat livre observa-se ser inferior ao valor de IC₅₀ do panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG-folato, porém esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,569$). Assim, sugere-se que o panobinostat livre seja mais eficaz, embora ambos os fármacos apresentem uma eficácia muito próxima. Porém, a encapsulação em nanopartículas e a vectorização ativa com o PEG-folato apresentam, entre outras vantagens, a diminuição da toxicidade do fármaco e o seu direcionamento.

Por fim, o valor de IC₅₀ do panobinostat encapsulado em lipossoma-PEG observa-se ser maior do que o valor de IC₅₀ do panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG-folato, porém esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,058$). Sugere-se assim, que a vectorização ativa do PEG-folato seja mais eficaz do que o lipossoma sem esta.

O panobinostat é um iHDAC, que já foi aprovado pela FDA para o tratamento do mieloma múltiplo humano (Veggel et al. 2017). Também já foi comprovado que este apresenta efeito citotóxico em várias linhas celulares (Takhar et al. 2015; Assouline et al. 2016; Tan et al. 2016). Neste estudo, como referido acima, tentou-se comprovar o efeito citotóxico deste na linha U87 de glioblastoma humano, *in vitro*.

Os resultados obtidos demonstram a potencialidade da eficácia do panobinostat como citotóxico nesta linha celular de glioblastoma humano. Neste estudo, o panobinostat na sua formulação livre foi o que causou menor viabilidade celular, sendo o mais citotóxico nesta linha. Porém, este fármaco apresenta alguns efeitos secundários como: lesões hepáticas (Slingerland et al. 2014), diarreia, neuropatia periférica, astenia, fadiga (Veggel et al. 2017), náuseas, vômitos, pirexia, perda de peso (San-Miguel et al. 2014) e sinais hematológicos (Veggel et al. 2017). Além disto, apresenta fraca penetração na barreira hematoencefálica (Lee et al. 2015: 201). Por estes motivos, existem vantagens em encapsulá-lo em lipossomas, podendo diminuir os seus efeitos adversos e aumentar a sua eficácia. O mesmo ocorreu com o doxorrubicina lipossomal, ao serem diminuídos os seus efeitos adversos (Gabizon et al. 2003). O panobinostat foi então encapsulado eficientemente em lipossomas e testada a sua citotoxicidade *in vitro*, sendo ligeiramente inferior ao fármaco livre. No entanto, são necessários mais ensaios *in vitro* para se avaliar se a diferença citotóxica será realmente estatisticamente significativa, visto que neste estudo foram apenas realizados dois ensaios independentes. Ensaios *in vivo* são também necessários para uma mais correta avaliação dos seus efeitos adversos e das suas vantagens.

Além disso, para melhorar a vectorização ativa e específica dos lipossomas para as células neoplásicas, recorreu-se a moléculas que estas células apresentam sobreexpressas na sua superfície (Riaz et al. 2018), no caso deste estudo - o folato (Bryne et al. 2008). O folato é a molécula mais estudada a nível oncológico, permitindo a internalização dos fármacos através dos recetores dos folatos existentes nas células neoplásicas (Bryne et al. 2008; Nehoff et al. 2014; Kuo and Chen 2015). Foram realizados ensaios de citotoxicidade de forma a avaliar a influência da associação desta molécula de direcionamento aos lipossomas. Consegue-se concluir que o panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG-folato na sua superfície apresenta uma viabilidade celular intermédia, superior à formulação livre e inferior à formulação de panobinostat apenas encapsulado em lipossoma-PEG sem ligando, na maioria das concentrações testadas nesta linha celular.

Os resultados obtidos evidenciam que o efeito citotóxico do fármaco livre e do fármaco encapsulado em lipossoma e direcionado para as células neoplásicas foi semelhante. Assim sendo, os lipossomas e as moléculas de direcionamento são bastante promissoras nesta área, visto que, potencialmente, ocorre a diminuição dos efeitos secundários, melhorando a qualidade de vida do animal, em relação ao fármaco livre.

3.3.2. Adenocarcinoma Mamário Humano

O adenocarcinoma mamário é uma neoplasia maligna com características invasivas e de metastização, sendo que o seu prognóstico depende do seu subtipo (Shi et al. 2006). Apesar de na sua maioria o cancro da mama não apresentar elevada mortalidade, apresenta elevada morbilidade (Edwards et al. 2005), sendo o segundo tipo de cancro mais comum (André et al. 2014). Para além disto, o cancro da mama é um dos três tipos de cancro mais comuns a metastizar no cérebro (DeAngelis and Posner 2009; Davis et al. 2012). À semelhança dos tumores primários cerebrais, os tumores secundários apresentam as mesmas dificuldades a nível da terapêutica. Agravando a situação, estes últimos podem apresentar uma maior resistência à terapêutica convencional visto que, potencialmente, as células primárias já foram expostas a esses fármacos e criaram mutações intrínsecas que as tornaram resistentes aos mesmos (Hu and Zhang 2009). As metástases cerebrais são cada vez mais uma complicação frequente, com diminuição da qualidade de vida e indicação de mau prognóstico (Steeg et al. 2011). Assim sendo, é necessário a investigação de novas abordagens terapêuticas.

Nesta dissertação de mestrado, além de avaliar a ação das formulações lipossomais e livre do panobinostat em tumores primários cerebrais como é o caso do glioblastoma humano, também se avaliou a sua eficácia em tumores cerebrais secundários, como é o caso da metastização do cancro da mama. Neste estudo utilizou-se a linha celular MCF7 de adenocarcinoma mamário humano para este fim.

Para esta avaliação foi necessário realizar ensaios de citotoxicidade. Contudo, a literatura não apresentava um consenso sobre o número de células a utilizar por poço. O estudo de Tambe et al. (2018) realizou os ensaios com a concentração de 1×10^4 células por poço. O estudo de Wright et al. (2010) realizou os mesmos com a concentração de 5×10^3 células por poço. Surgiu então a necessidade de realizar uma otimização do protocolo experimental em relação ao número de células.

3.3.2.1. Otimização do protocolo experimental – número de células

Com o objetivo de realizar uma otimização do número de células por poço para esta linha celular, foram realizados ensaios de citotoxicidade na linha celular MCF7. Foram utilizadas duas concentrações diferentes de células - 5×10^3 e 1×10^4 - por poço (Figura 16) e foi adicionado o panobinostat encapsulado em lipossoma nas mesmas concentrações testadas na linha U87, em ambas. Foram realizados dois ensaios individuais em duplicados e os resultados foram apresentados num gráfico com a média dos dois ensaios. Apesar dos resultados serem muito semelhantes, observou-se que a concentração celular utilizada no

ensaio que melhor permitia a observação dos efeitos citotóxicos do panobinostat foi a de 5×10^3 células por poço.

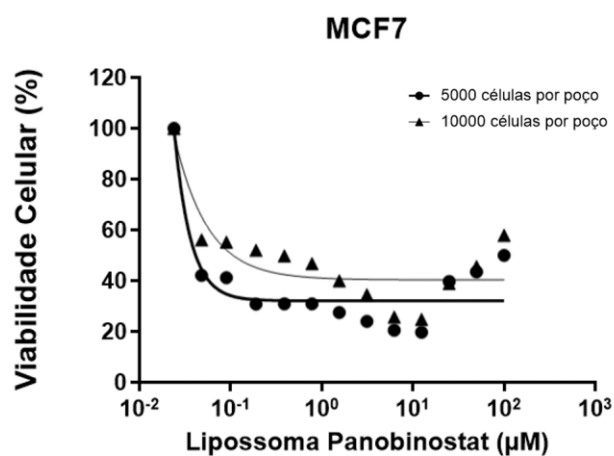


Figura 16 - Representação gráfica dos efeitos citotóxicos da formulação de panobinostat encapsulado em lipossoma, em duas concentrações diferentes de MCF7.

3.3.2.2. Otimização do protocolo experimental – concentração de fármaco

Após a otimização do número de células por poço, seguiram-se os ensaios de citotoxicidade com panobinostat livre, panobinostat encapsulado em lipossoma-PEG e panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG-folato, utilizando a concentração de 5×10^3 células por poço. Foram retiradas as duas concentrações superiores do fármaco e foram adicionadas duas inferiores, comparativamente aos ensaios com a linha U87. Visto que as concentrações mais elevadas não apresentavam resultados significativos para este estudo, devido à diminuição da citotoxicidade nestas concentrações. Foram utilizadas concentrações em gradiente decrescente entre 25 µM e 0,012 µM com uma diluição de 1:2 entre cada. À semelhança do anterior, foram realizados dois ensaios individuais com poços duplicados (Figura 17). Foi realizado um gráfico com desvio padrão da média dos dois ensaios realizados, para cada formulação (Figura 18).

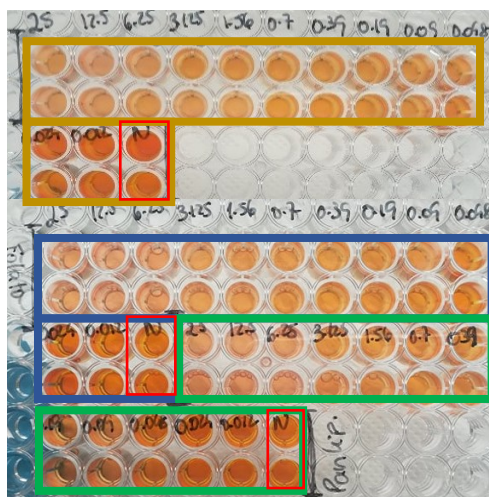


Figura 17 - Imagem representativa do ensaio de citotoxicidade realizado na linha celular MCF7 de adenocarcinoma mamário humano.

Legenda: Amarelo – células MCF7 tratadas com panobinostat livre; Azul - células MCF7 tratadas com panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG e folatos; Verde – células MCF7 tratadas com panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG; Vermelho – controlo negativo de células tratadas apenas com meio DMEM a) b).

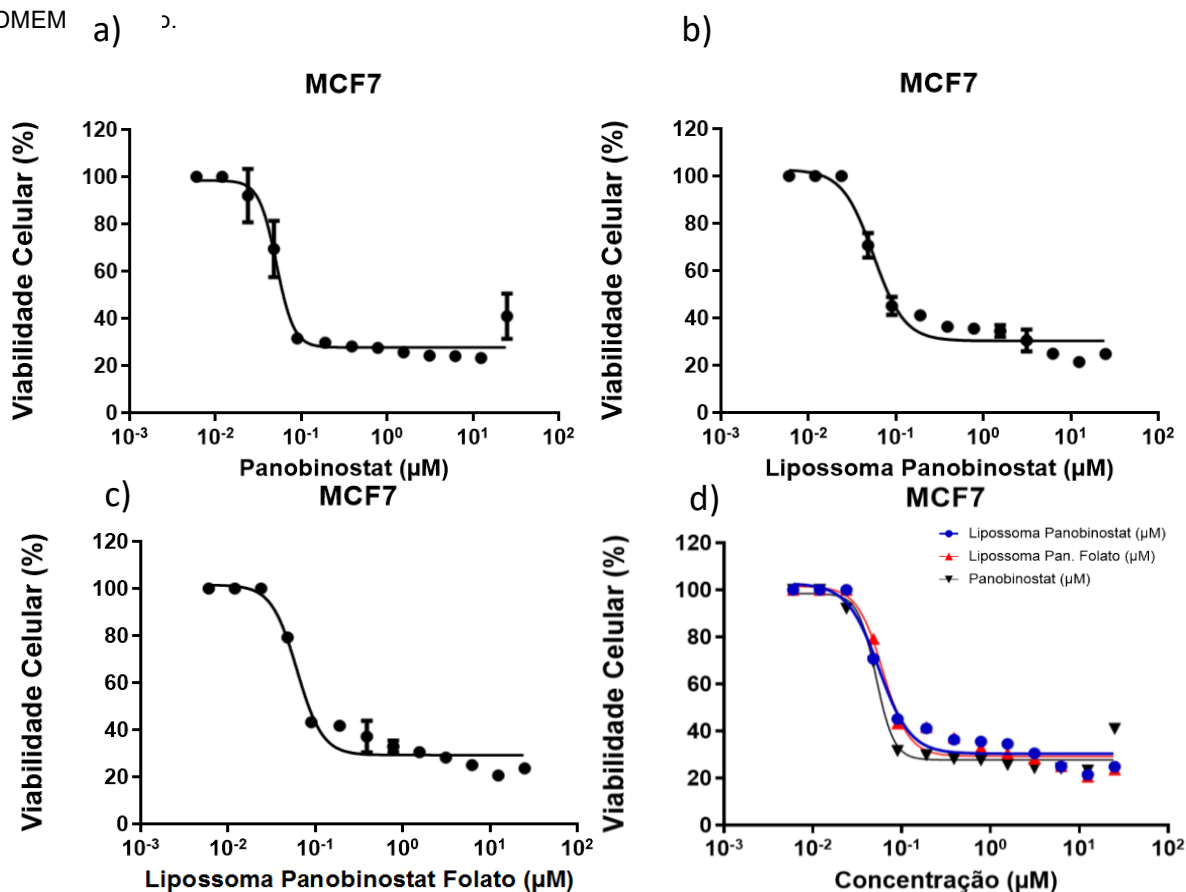


Figura 18 - Representações gráficas do efeito citotóxico das formulações de panobinostat em MCF7.

Legenda: A figura apresenta três gráficos a), b) e c) da média da viabilidade celular da linha celular MCF7 para cada formulação de panobinostat contendo o desvio padrão. O gráfico d) compara as várias formulações de panobinostat, ficando visivelmente perceptível as diferenças dos efeitos citotóxicos destas, na linha celular MCF7.

Na Tabela 77, encontram-se os respectivos valores da média e desvio padrão do IC₅₀ obtidos para cada formulação testada na linha celular MCF7.

Tabela 7 - Valores de IC₅₀ (μM) de cada formulação testada em MCF7.

Fármacos	IC₅₀ (μM)
Panobinostat livre	0,051 ± 0,028
Panobinostat Lipossoma	0,055 ± 0,039
Panobinostat Lip. Folato	0,061 ± 0,033

A análise estatística foi realizada de acordo com o representado no ANEXO II. Pelo teste de Shapiro-Wilk foi possível aferir que os valores de IC₅₀ seguem uma distribuição aproximadamente normal ($p=0,291$, $p>0,05$), com um nível de significância de 5%. Assim, existe evidência estatística de que não se rejeita a hipótese nula (H_0) (H_0 = os dados apresentam uma distribuição aproximadamente normal). Assim, foi aplicada uma ANOVA para análise da variância dos resultados. Para identificar as médias que diferem entre si, foi aplicado um teste de Tukey como complemento à ANOVA.

Realizando a análise dos dados da Figura 18 e da Tabela 77, para a linha celular MCF7, observa-se que o valor de IC₅₀ do panobinostat livre é o mais baixo relativamente ao das outras duas formulações. O valor de IC₅₀ mais elevado demonstrou-se ser o do panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG-folato. O valor de IC₅₀ do panobinostat encapsulado em lipossoma-PEG apresenta-se intermédio em relação aos anteriores. No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Os resultados obtidos neste estudo *in vitro*, demonstraram que o panobinostat também apresenta eficácia citotóxica numa linha de tumores cerebrais secundária, a linha celular MCF7 de adenocarcinoma mamário humano. Como supracitado, este fármaco na sua formulação livre apresenta efeitos secundários adversos que poderão ser contornados pela sua encapsulação em lipossomas, podendo aumentar também a sua eficácia. Assim sendo, apesar do valor de IC₅₀ do panobinostat livre ser inferior às formulações lipossomais, estas poderão apresentar vantagens, como descrito anteriormente relativamente ao glioblastoma.

Além disto, também foi avaliada a eficácia da adição da molécula de direcionamento ativo – folato – comparativamente à formulação livre e lipossomal sem direcionamento para as células neoplásicas. Neste caso, a formulação lipossomal com PEG-folato aparentemente não apresenta vantagem sobre a formulação lipossomal, apresentando um IC₅₀ superior ao da última. Apesar disto, no gráfico d) da Figura 18, pode-se observar que, em determinadas concentrações, a viabilidade celular do panobinostat encapsulado em

lipossoma com PEG-folato é ligeiramente inferior à formulação lipossomal sem direcionamento.

Contudo, apesar da formulação lipossomal apresentar uma diminuição da viabilidade celular relativamente semelhante à formulação livre, o lipossoma pode apresentar as vantagens já enumeradas anteriormente, principalmente: a diminuição dos efeitos adversos, aumento da sua biodisponibilidade e potencialmente ocorrer melhor penetração a nível da barreira hematoencefálica. Devido aos efeitos de citotoxicidade serem muito semelhantes, nada se pode concluir em relação às vantagens do direcionamento ativo nesta linha celular. Porém, são necessários mais ensaios *in vitro* para avaliar se a diferença de citotoxicidade entre as formulações livres e lipossomais são estatisticamente significativas e ensaios *in vivo* para melhor avaliar os respetivos efeitos adversos e a real eficácia.

O estudo de Rao et al. (2010) demonstrou que o panobinostat apresentava acetilação em algumas HDAC na linha celular MCF7, induzindo a morte celular. Além disto, este estudo também concluiu que a acetilação destas HDAC ocorria nas concentrações mais baixas de panobinostat, não ocorrendo nas mais elevadas, colocando a hipótese de ocorrer a ativação de outros mecanismos de morte celular, menos eficazes (Dokmanovic et al. 2007; Fiskus et al. 2008). Estes resultados são concordantes com os obtidos no estudo agora apresentado.

3.3.3. Células Endoteliais Cerebrais de Rato

A barreira hematoencefálica é composta por células endoteliais dos capilares cerebrais (Rubin and Staddon 1999). Estas células expressam na sua superfície iões específicos e péptidos transportadores formando uma barreira transcelular e paracelular através das *tight junctions* entre células endoteliais adjacentes (Abbott et al. 2010). Recentemente, para estudos *in vitro* da funcionalidade da BBB, têm sido utilizadas linhas imortalizadas de células endoteliais cerebrais (Gumbleton and Audus 2001). O estudo de Watanabe et al. (2013) demonstrou que a linha celular bEnd.3, composta por células endoteliais cerebrais de rato, apresenta propriedades específicas de restrição à passagem de moléculas, nomeadamente, o fato desta linha celular expressar elevados níveis e uma distribuição eficiente das *tight junctions*. Este fato confere-lhe um grande potencial de utilização desta como barreira paracelular em ensaios *in vitro*, comparativamente a outras linhas celulares semelhantes. Por este motivo, a linha celular bEnd.3, foi a utilizada nos ensaios desta dissertação.

Esta linha celular foi incluída neste estudo com o objetivo de ser utilizada nos ensaios do modelo da BBB *in vitro*, porém foi necessário verificar se o tratamento com o fármaco panobinostat na sua formulação livre apresentava citotoxicidade para estas células.

Além disso, foi necessária uma otimização do protocolo experimental em relação aos tempos de tratamento com o fármaco, de modo a observar se este apresenta efeitos citotóxicos nesta linha celular ao longo do tempo.

3.3.3.1. Otimização do protocolo experimental – tempos de tratamento

Para observar o comportamento do panobinostat na sua formulação livre, na linha celular bEnd.3, foram realizados ensaios de citotoxicidade com diferentes tempos de exposição – 3, 6 e 24 horas – de forma a observar se este afeta as células da barreira hematoencefálica ao longo do tempo. Os tempos de exposição foram os mesmos que os utilizados no ensaio do modelo da BBB *in vitro*. Foram realizados dois ensaios individuais para cada tempo de exposição, com poços duplicados.

Conforme observado na Figura 19, a viabilidade da linha celular bEnd.3, nos três tempos de exposição testados, apresenta sempre o seu valor máximo - 100%. O resultado dos ensaios poderá indicar-nos que esta linha celular não é afetada pelo panobinostat na sua formulação livre, pelo menos na concentração testada. Assim sendo, pode-se concluir que esta linha celular pode ser utilizada no ensaio do modelo da BBB *in vitro* sem que o panobinostat atue sobre esta, não se verificando a diminuição da sua viabilidade celular, mantendo a integridade da barreira.

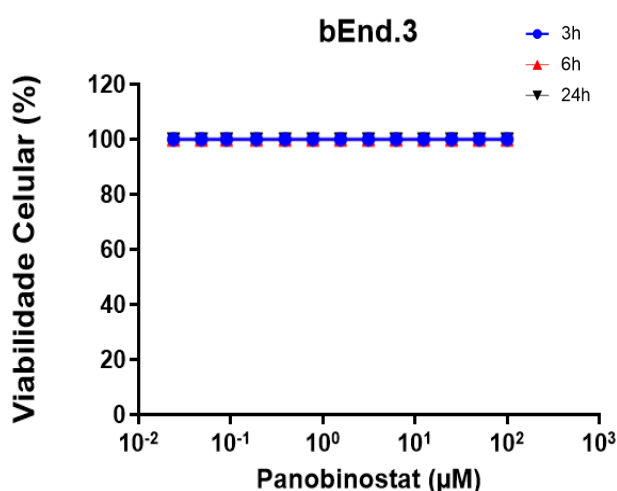


Figura 19 - Representação gráfica comparativa da viabilidade celular da linha bEnd.3 sob exposição do panobinostat livre em 3 tempos de exposição diferentes.

Após a otimização do tempo de tratamento com o panobinostat livre, observou-se que até às 24 horas de contato entre o fármaco e as células não ocorria diminuição da viabilidade celular. De seguida, foi-se testar se as formulações lipossomais com o tempo de exposição máximo (24 horas) apresentam efeitos citotóxicos nesta linha celular. Foram

realizados dois ensaios individuais com poços em duplicado para o panobinostat livre e apenas um ensaio com poços duplicados para cada formulação lipossomal.

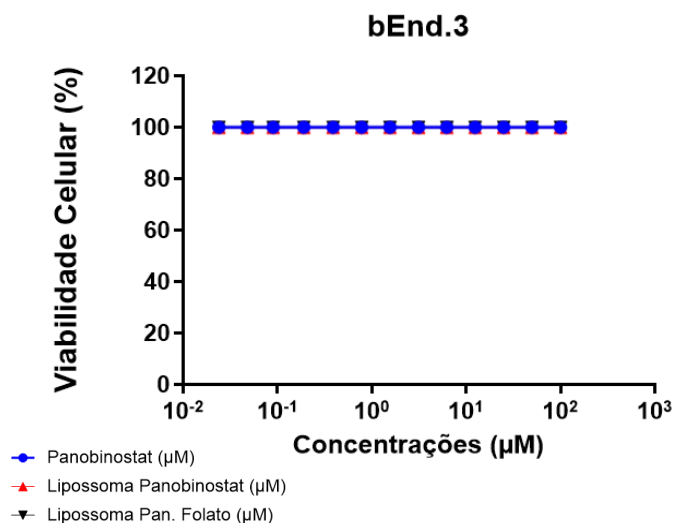


Figura 20 - Representação gráfica comparativa da viabilidade celular da linha bEnd.3 sob exposição das várias formulações de panobinostat com o tempo de exposição de 24h.

Analisando o gráfico da Figura 20, observa-se que a viabilidade da linha celular bEnd.3 mantém-se em 100% em todas as concentrações testadas de todas as formulações de panobinostat. Assim, pode-se concluir que, potencialmente, os lipossomas também não interagem com as células endoteliais da barreira hematoencefálica desta linha celular, não apresentando citotoxicidade sobre esta. Além disso, foi testado o panobinostat encapsulado em lipossoma com o folato como molécula de direcionamento ativo. Visto que este também não apresentou citotoxicidade nesta linha celular, isto poderá indicar que o folato não foi reconhecido como molécula transportadora, não tendo libertado o panobinostat nestas células.

A linha celular bEnd.3 apresenta os requisitos necessários para ser utilizada no modelo da BBB *in vitro*, mimetizando a barreira hematoencefálica, visto que, as células não são destruídas pelo citotóxico em todas as concentrações testadas e nas várias formulações. Porém, são necessários mais ensaios para se conseguir fazer esta conclusão de forma estatisticamente significativa.

Estes resultados apresentam-se em concordância com o estudo de Li et al. (2018) que utilizou a linha celular bEnd.3 como células endoteliais cerebrais mimetizando a barreira hematoencefálica no modelo da BBB *in vitro*.

3.4. Modelo BBB *in vitro*

A barreira hematoencefálica (BBB) é uma das barreiras que protege o cérebro da entrada de agentes patogénicos ou substâncias tóxicas no sistema nervoso central (SNC)

(Abbott et al. 2010). Este fato representa uma vantagem quando as substâncias que tentam atravessá-la irão provocar danos ao SNC (Lim et al. 2007). Porém, quando é necessário que os fármacos atuem neste local, a BBB torna-se um obstáculo à sua passagem (Gingrich and Traynelis 2000). As terapêuticas convencionais utilizadas apresentam uma série de desvantagens e de limitações à passagem dos fármacos através da BBB. Por este motivo, ao longo dos anos, tem-se realizado estudos nesta área, com o objetivo de encontrar alternativas que permitam uma passagem facilitada através da BBB, atuando localmente (Markman et al. 2013; Sadozai and Saeidi 2013). Uma dessas alternativas é a nanomedicina, que estuda partículas de pequenas dimensões como possíveis meios de transporte e de direcionamento de moléculas, podendo estas ter a capacidade de melhorar o transporte (Hu and Zhang 2009; Kim et al. 2010).

Para um melhor estudo da fisiologia da BBB, da atividade das substâncias citotóxicas e das nanopartículas sobre a barreira hematoencefálica, foram criados modelos *in vitro* (Terasaki et al. 2003). Porém, até agora foram testados modelos da BBB *in vitro* que consistiam apenas no plaqueamento de uma linha de células endoteliais cerebrais imortalizadas, num sistema que permitia o estudo do transporte de fármacos através da BBB e das suas características (Li et al. 2018). Nesta dissertação propõe-se a criação de um modelo da BBB *in vitro* que adicionam células neoplásicas num nível inferior às endoteliais cerebrais (Figura 21). Com o objetivo de avaliar não só o transporte dos fármacos e a integridade da barreira hematoencefálica, mas também, se após atravessá-la, os mesmos conseguem atuar nas células neoplásicas, induzindo a sua morte celular. Da pesquisa realizada e tanto quanto é do conhecimento da autora ainda não foi proposto um sistema semelhante a este, sendo pois este um estudo pioneiro.

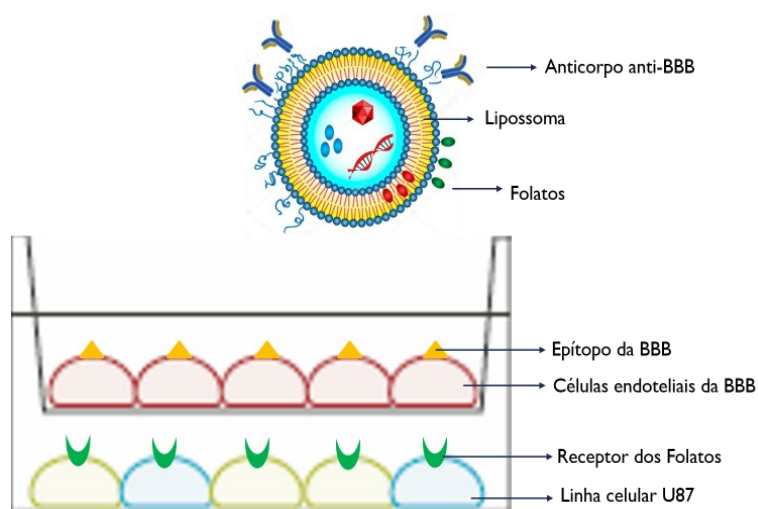


Figura 21 - Esquematização do modelo da BBB *in vitro* e células U87 proposto (original da autora).

Numa primeira fase do estudo do modelo da BBB *in vitro*, o objetivo foi comparar a capacidade de ligação dos anticorpos FC5 e G3 às células endoteliais dos capilares cerebrais utilizadas no modelo e a sua eficiência em atravessar a barreira, de modo a selecionar o anticorpo mais eficiente para a vectorização ativa dos lipossomas para a BBB, a ser usado em ensaios posteriores. Os anticorpos foram ligados aos lipossomas (Figura 22) através da técnica de ligação da biotina-estreptavidina-biotina (Diamandis and Christopoulos 1991). Este é considerado um método fiável devido a uma forte ligação biomolecular entre as duas moléculas (Papadia et al. 2014).

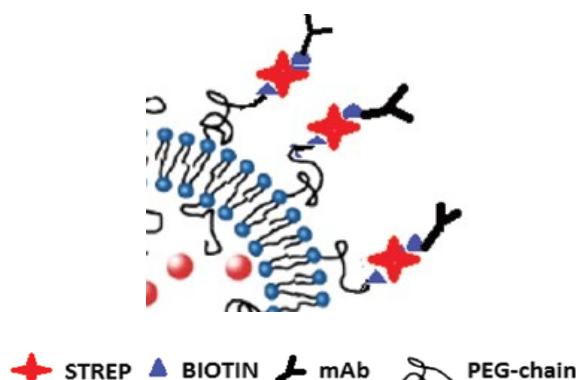


Figura 22 - Ligação do anticorpo ao lipossoma através da técnica de ligação biotina-estreptavidina-biotina (adaptado de Papadia et al. 2014).

Além da comparação entre os dois anticorpos, avaliou-se a eficácia dos lipossomas ligados aos anticorpos em relação ao lipossoma sem vectorização ativa. Para cada composto foram utilizados *inserts* em duplicado. Numa primeira fase deste estudo, o seu objetivo foi testar a eficiência de passagem através da BBB e medição da integridade da mesma, dos seguintes compostos: anticorpo (Ac) FC5 no tempo de exposição das 3 horas; Ac G3 no mesmo tempo de exposição; Ac FC5 ligado ao lipossoma através do método da biotina em três tempos de exposição diferentes – 3,6 e 24 horas; Ac G3 ligado ao lipossoma através do método da biotina em três tempos de exposição diferentes – 3, 6 e 24 horas; lipossoma com ligação PEG-biotina em dois tempos de exposição diferentes – 6 e 24 horas.

Por fim, foi realizado o primeiro teste do ensaio *in vitro* da BBB + U87, em que foi utilizado como composto o panobinostat livre, de modo a verificar se este degrada a BBB, se consegue atravessar e se consegue induzir morte celular nas células neoplásicas U87 de glioblastoma humano. Neste ensaio foi testado o panobinostat livre em dois tempos de exposição diferentes – 6 e 24 horas.

Neste estudo apenas foi realizado um ensaio dos modelos da BBB e da BBB + U87 *in vitro*, sendo necessários ensaios posteriores de forma a observar se os resultados obtidos são mantidos e estatisticamente significativos. Para a criação deste novo modelo foi necessário realizar algumas otimizações. Foi utilizada a linha celular U87 de glioblastoma

humano como linha celular neoplásica a ser plaqueada inferiormente à linha da BBB. Para isto, foi necessário otimizar o número de células a serem plaqueadas num poço de uma P24.

3.4.1. Otimização do protocolo experimental – número de células U87

Para a otimização do número de células da linha U87 a plaquear por poço numa placa de 24 poços, foi realizado apenas um ensaio de citotoxicidade com poços duplicados. Foram escolhidas 4 concentrações – 25; 6,25; 0,19; e 0,048 μM – tendo sido utilizado panobinostat na sua formulação livre para este ensaio. Foram plaqueadas 3×10^4 células por poço, segundo os cálculos descritos nos materiais e métodos.

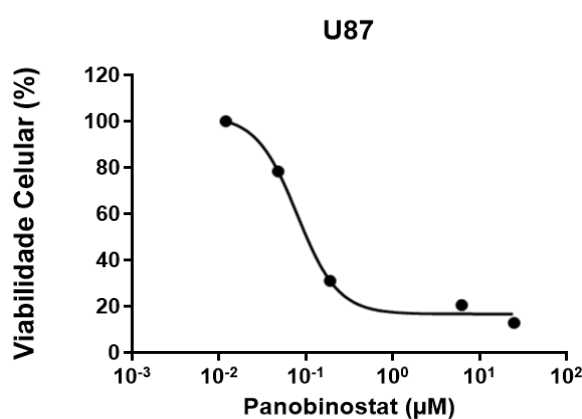


Figura 23 - Representação gráfica dos efeitos citotóxicos do panobinostat livre nas células U87 em P24.

Analisando o gráfico da Figura 23, verifica-se que a adaptação do número de células por poço de uma placa de 96 poços (P96) para uma P24 foi realizada com sucesso, obtendo-se uma curva semelhante. O IC_{50} obtido foi 80 nM, ligeiramente inferior ao obtido no ensaio com a P96. Visto que apenas foi realizado um ensaio, é necessário a realização de mais ensaios para comprovar este resultado. Porém, devido à necessidade de avançar para a realização do ensaio da BBB *in vitro*, foi utilizado este número de células.

3.4.2. Integridade da barreira no modelo *in vitro*

Para a realização do ensaio da BBB *in vitro* é necessário que as células endoteliais dos capilares cerebrais, que mimetizam a barreira hematoencefálica, formem ligações entre si através das *adherens junctions* (AJs) e das *tight junctions* (TJs). A ligação entre as células deverá ocorrer de forma a que estas apresentem no mínimo 95% de impermeabilidade, deixando passar apenas 5% das moléculas. Para isto, é expectável que se espere cerca de 11 a 13 dias após o plaqueamento das células para realização do ensaio, de forma a que estas estabeleçam este tipo de ligações.

No início do ensaio, é essencial fazer a avaliação da integridade da barreira constituída pelas células, com o objetivo de verificar: se os *inserts* utilizados se encontram em boas condições e reteram as células na sua superfície; se as células não sofreram fenómenos de lise; para analisarmos os resultados do ensaio da eficiência da passagem dos fármacos através da BBB de forma correta, ou seja, analisando-os sabendo que a integridade da barreira se assemelhava à *in vivo* no início; ou ainda, comparar estes valores de integridade da barreira com os valores das avaliações de integridade finais, após o ensaio da eficiência de passagem, concluindo se o fármaco destruiu as células da barreira. Esta informação não é completamente fiável, visto que, a avaliação da integridade inicial é feita apenas em dois *inserts* aleatórios que não os utilizados posteriormente, podendo haver algum *insert* que apresente a sua integridade diminuída e não seja detetado previamente.

A avaliação da integridade da barreira, realizada de acordo com a equação 1 mencionada nos materiais e métodos, foi realizada 11 dias após o plaqueamento das células, obtendo-se uma média dos dois *inserts* selecionados de 89% de integridade. Tendo em conta que a integridade era inferior a 95%, esperou-se mais 3 dias e só depois se realizou o ensaio.

Após o ensaio da eficiência, como citado anteriormente, é realizada uma nova avaliação da integridade da barreira (Figura 24), para verificarmos se as formulações utilizadas atuaram sobre ela degradando-a.

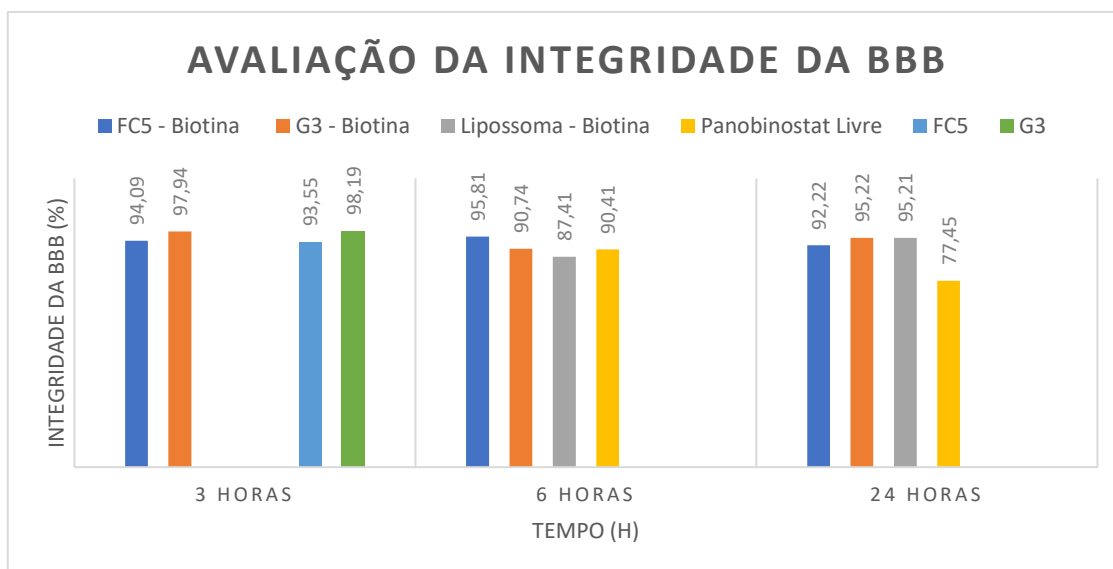


Figura 24 - Representação gráfica dos resultados obtidos da avaliação da integridade da BBB (%) após a atuação dos vários compostos, nos diferentes tempos de exposição.

Legenda: FC5-Biotina: abreviação para a ligação do anticorpo FC5 ao lipossoma-PEG vazio através da técnica da biotina-estreptavidina-biotina; G3-Biotina: abreviação para a ligação do anticorpo G3 ao lipossoma-PEG vazio

através da técnica da biotina-estreptavidina-biotina; Lipossoma-Biotina: abreviação para a ligação do lipossoma-PEG à biotina; Panobinostat livre: formulação de panobinostat livre; FC5 – anticorpo FC5; G3 – anticorpo G3.

Analisando os resultados da medição da integridade da BBB, verifica-se que a atuação do FC5 e G3 na barreira durante 3 horas não apresenta grande degradação da mesma, tanto sozinhos como ligados à biotina. Em relação ao tempo de exposição das 6 horas, o lipossoma-biotina foi o que apresentou menor integridade da barreira e o FC5-biotina o que manteve a integridade mais perto da inicial. Após 24 horas de contato entre os compostos e as células da BBB do modelo *in vitro*, o panobinostat livre foi o que apresentou a maior degradação desta, diminuindo bastante a sua integridade. O lipossoma-biotina e o G3-biotina mantiveram a integridade da BBB em valores superiores a 95%, valor mínimo requerido de integridade. O composto FC5-biotina, por sua vez, diminuiu ligeiramente a integridade.

Comparando os resultados entre si, pode-se concluir que a concentração utilizada de panobinostat livre apresenta toxicidade para as células da barreira hematoencefálica, sendo necessário uma otimização desta. Além disso, concluiu-se que não existem alterações de realce na integridade da BBB entre os tempos de exposição das 3 e 6 horas, utilizando-se potencialmente apenas os tempos de exposição 6 e 24 horas nos ensaios seguintes. Para uma melhor avaliação destes resultados, fomos avaliá-los em conjunto com os resultados da eficiência de passagem destes compostos através da BBB, verificando assim se o aumento da eficiência se deve à eficácia do composto ou apenas à diminuição da integridade que facilitou a passagem destes.

3.4.3. Eficiência de passagem dos compostos no modelo *in vitro*

A eficiência de passagem destes compostos é avaliada através da leitura da fluorescência da rodamina (Cooksey 2015) ligada à superfície dos lipossomas, do recolhido do fundo do poço da P24, após os compostos terem atravessado a barreira. Ou seja, se for detetada fluorescência da rodamina é porque os compostos que contém lipossomas foram capazes de atravessar a BBB. Quanto maior a fluorescência medida, mais rodamina e lipossomas passaram a barreira e foram recolhidos no poço da P24. Os resultados do ensaio encontram-se representados na Figura 25. Não foi calculada a eficiência de passagem do panobinostat livre nem dos anticorpos FC5 e G3, visto que estes não apresentavam ligação ao lipossoma, ou seja, não existindo rodamina, não apresenta fluorescência.

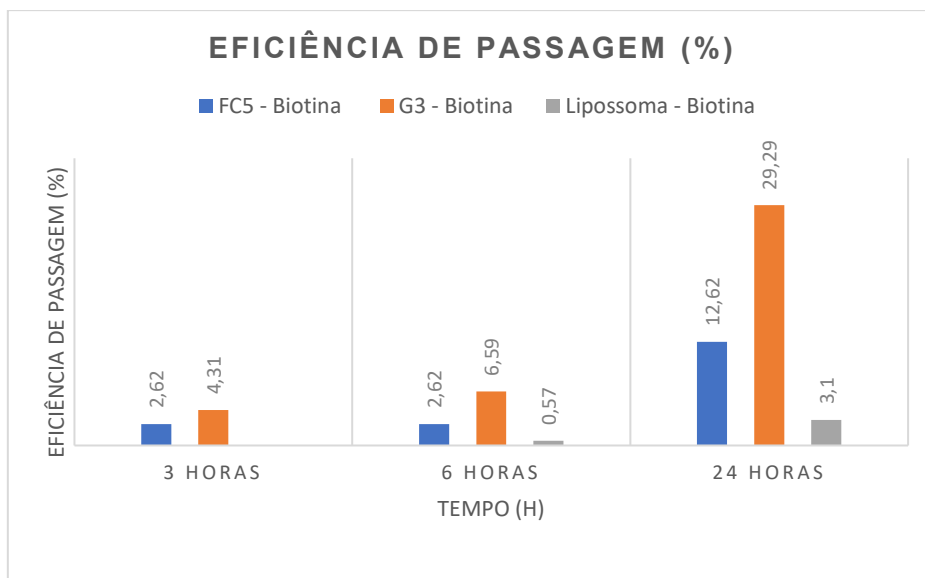


Figura 25 - Representação gráfica dos resultados obtidos da eficiência de passagem (%) dos vários compostos, nos diferentes tempos de exposição.

Legenda: FC5-Biotina: abreviação para a ligação do anticorpo FC5 ao lipossoma-PEG vazio através da técnica da biotina-estreptavidina-biotina; G3-Biotina: abreviação para a ligação do anticorpo G3 ao lipossoma-PEG vazio através da técnica da biotina-estreptavidina-biotina; Lipossoma-Biotina: abreviação para a ligação do lipossoma-PEG à biotina.

Com base nos resultados do ensaio realizado, observa-se que em todos os *timepoints*, o G3-biotina apresenta maior eficiência de passagem, em segundo lugar o FC5-biotina e por último, o lipossoma-biotina sem direcionamento ativo. À semelhança da integridade, a eficiência de passagem através da BBB não apresenta diferenças significativas entre as 3 e as 6 horas. No *timepoint* das 24 horas, é quando se consegue realçar o aumento da passagem dos compostos. Observa-se que os lipossomas com anticorpo para direcionamento ativo são mais eficazes em atravessá-la do que o lipossoma sem este. Salienta-se o resultado obtido com o G3, anticorpo experimental, não só apresentando uma eficiência superior à do FC5, que foi utilizado como anticorpo controlo, mas também por conseguir uma eficiência de passagem perto dos 30%, bastante superior relativamente aos estudos realizados publicados. Sendo que o G3-biotina apresenta uma integridade da BBB > 95%, isto quer dizer que, além deste composto não destruir significativamente a barreira, apresentou uma grande eficiência em atravessá-la. Podemos, então, induzir que o composto G3-biotina é o mais eficaz. Colocando este anticorpo na linha da frente desta investigação, como nova molécula de direcionamento ativo para a BBB. Porém, são necessários mais ensaios para verificação destes resultados.

3.4.4. Viabilidade celular das células U87

No modelo proposto *in vitro* da BBB + U87, nos *inserts* utilizou-se o panobinostat na sua formulação livre, como anteriormente referido. Neste caso, no fundo do poço da P24, por baixo dos *inserts*, foram plaqueadas células de glioblastoma humano da linha U87.

Como referido nos materiais e métodos, após 24 horas de atuação do composto nas células da BBB no *insert* este foi retirado, deixando-se o composto que tinha conseguido atravessar as células da barreira atuar nas células neoplásicas por mais 48 horas, totalizando as 72 horas utilizadas nos ensaios de citotoxicidade realizados anteriormente. O objetivo foi a verificação da indução da morte celular pelo fármaco que conseguiu atravessar a barreira, nesta linha celular. Foram utilizados dois controlos para as células U87. Um controlo positivo, tendo sido adicionada a mesma concentração de panobinostat livre a um poço da P24 com células U87, mas este sem *insert*, de forma a verificar se as propriedades do fármaco se encontravam ativas, reduzindo a viabilidade celular das células neoplásicas. Um controlo negativo, tendo sido adicionado apenas meio DMEM completo, também sem *insert*, para verificar a viabilidade celular desta linha. Para cada tempo de exposição e composto foram utilizados poços duplicados. Após o término dos tempos de exposição predefinidos, foi retirada a solução com o tratamento e adicionada uma nova solução com WST-1 a cada poço, foi lida a absorvância e realizou-se o gráfico da Figura 26 com a média das absorvâncias obtidas dos poços duplicados.

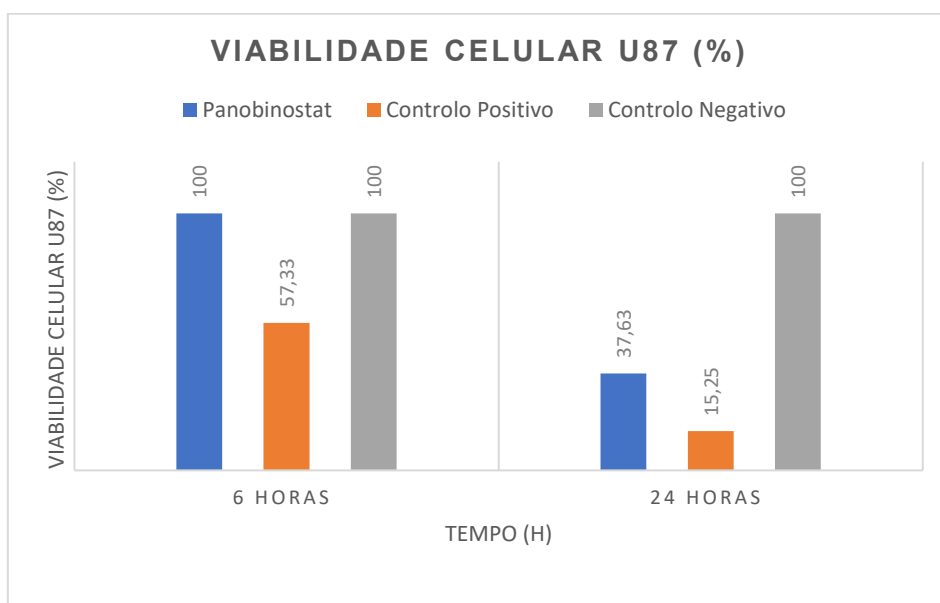


Figura 26 - Representação gráfica dos efeitos citotóxicos do panobinostat livre na linha celular U87, em dois tempos de exposição diferentes.

Interpretando o gráfico com os resultados, o controlo positivo apresenta uma viabilidade celular de 100%, indicando que o ensaio ocorreu com as condições necessárias para as células se manterem metabolicamente ativas. O controlo negativo apresenta uma viabilidade celular superior no tempo de exposição das 6 horas comparativamente às 24 horas, de acordo com o esperado, sendo que ocorreu mais tempo de contato do fármaco com as células no último, induzindo uma maior percentagem morte celular. Em relação ao panobinostat, nas 6 horas de passagem do fármaco através da barreira não se verificou

alteração da viabilidade celular, permanecendo as células vivas. Porém, após 24 horas de passagem do fármaco através da barreira, este já apresentou uma concentração suficiente para induzir morte celular, reduzindo substancialmente a viabilidade destas. Pode-se concluir, com base nos resultados obtidos, que o panobinostat não atravessa a BBB *in vitro* em concentração suficiente para induzir morte celular, em 6 horas. O tempo de exposição das 24 horas foi o mais indicado para se observar morte celular na linha U87. Porém, este resultado pode também ser devido à grande diminuição da integridade da barreira observada nas 24 horas (77,45% de integridade da BBB, Figura 24), colocando-se a hipótese de que a diminuição da viabilidade celular na linha U87 seja devida à maior passagem de fármaco por desintegração da barreira. São necessários mais ensaios com otimização da concentração de panobinostat e dos tempos de exposição utilizados, de forma a que ocorra um compromisso entre uma passagem eficiente deste fármaco através da BBB, mas sem ocorrer danificação desta (diminuição da sua integridade).

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo principal deste estudo foi contribuir para o desenvolvimento de um imunolipossoma, com duplo direcionamento ativo para células de tumores cerebrais primários (U87) e secundários (MCF7) e além disso, para as células da barreira hematoencefálica (bEnd.3), de modo a este ser utilizado no tratamento de tumores cerebrais (Figura 27).

Concluiu-se que a utilização do panobinostat encapsulado em lipossomas apresenta vantagens em relação ao panobinostat livre. Apesar da atividade terapêutica ser muito semelhante tanto na linha celular de tumores cerebrais primários (U87) como secundários (MCF7), as nanopartículas apresentam outras vantagens como a diminuição dos efeitos secundários e o seu direcionamento ativo, podendo torná-las mais vantajosas. Além disto, demonstrou-se que o panobinostat encapsulado com lipossoma, apresentando vectorização ativa com o ligando PEG-folato, é mais eficaz na linha celular de tumores cerebrais primária. Isto sugere que o direcionamento específico dos lipossomas para os recetores de folato das células neoplásicas poderá ser mais vantajoso em relação à internalização dos fármacos nas células, potenciando o seu efeito. Em relação à linha celular de tumores de adenocarcinoma mamário metastizados no cérebro não foi observada diferença significativa. Observou-se também que o panobinostat não apresenta efeito citotóxico para as células endoteliais dos capilares cerebrais de rato (bEnd.3), tendo sido esta linha celular a escolhida para os modelos da BBB *in vitro*.

Em relação ao ensaio da BBB *in vitro*, conclui-se que o anticorpo selecionado - G3 - é mais eficaz a atravessar a barreira hematoencefálica em relação ao FC5, o anticorpo controlo. Além disto, demonstrou-se que o direcionamento ativo com este anticorpo apresenta maior eficácia para atravessar a BBB comparativamente à nanopartícula sem o ligando. Sugere-se assim, que a vectorização ativa dos lipossomas com o anticorpo G3 é vantajosa para atravessar a BBB sem provocar toxicidade. Por fim, foi proposto um novo modelo da BBB *in vitro*, em que incluía o uso de uma linha celular de tumores cerebrais primária (U87), tendo esta dissertação contribuído para o desenvolvimento deste. Conclui-se que o panobinostat é capaz de atravessar as células da BBB e apresentar efeito citotóxico nas células neoplásicas. Porém, são necessárias mais otimizações deste modelo.

Os objetivos deste trabalho prático foram cumpridos. Os estudos *in vitro* que foram realizados nesta dissertação de mestrado demonstraram a eficácia dos lipossomas, tanto como sistemas de transporte de fármacos, como sistemas de direcionamento destes para células neoplásicas e da barreira hematoencefálica, aquando da ligação de vetores

específicos. Assim, conseguimos ter em vista a produção de um sistema de *drug delivery* bi-específico, que facilite a penetração através da barreira hematoencefálica e que seja direcionado para uma célula ou tecido, podendo ser transversal a Medicina Veterinária e Humana. Nesta dissertação testámos este modelo proposto na área da oncologia para o glioblastoma humano, mas o objetivo é realizar a otimização deste para futuramente ser utilizado em outras neoplasias ou outras áreas em que exista necessidade dos fármacos ou outras substâncias atravessarem a BBB e atuarem localmente.

No futuro, são necessários mais ensaios *in vitro* para comprovar estes resultados e realizar otimizações do modelo proposto, culminando na realização de um ensaio com o modelo da BBB + U87 *in vitro* utilizando o panobinostat encapsulado em lipossoma com duplo direcionamento ativo com o PEG-folato e o anticorpo G3. Posteriormente, serão necessários ensaios de eficácia, biodistribuição e toxicidade para avaliação, *in vivo*, dos reais efeitos destes compostos, tanto em murganhos como potencialmente em modelos caninos.

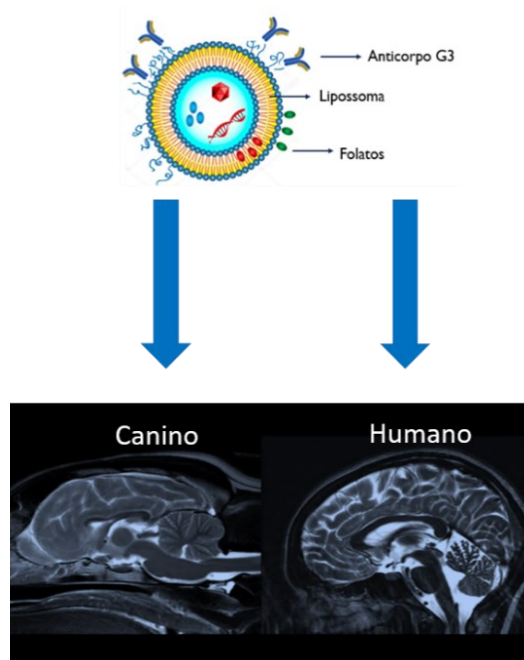


Figura 27 - Esquematisação do sistema de entrega de fármacos com duplo direcionamento ativo transversal a Medicina Veterinária e Medicina Humana (original da autora, imagens do cérebro canino e humano de Gegory Berns)

BIBLIOGRAFIA

Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley D. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease*.:13–25.

Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Rev Neuroscience*.:41–53.

Abulrob A, Sprong H, van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D. 2005. The blood–brain barrier transmigration single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*.:1201–1214.

Adamson C, Kanu OO, Mehta AI, Di C, Lin N, Mattox AK, Bigner DD. 2009. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs* (2009).(18(8)):1061–1083.

Aires da Silva F, Aguiar S, Andre S, Oliveira S. 2017. Single domain antibodies for brain targeting and drug delivery across the blood-brain barrier. *National Patent Application No 2017/1000081464*.

Aires da Silva F, Corte-Real S, Gonçalves J. 2008. Recombinant Antibodies as Therapeutic Agents: Pathways for Modeling New Biodrugs. *Biodrugs*.:301–314.

Alavi M, Hamidi M. 2019. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*.:1–8.

Algibes L, Andre F, Balleyguier C, et al. 2005. Spectrum of breast cancer metastasis in BRCA1 mutation carriers: highly increased incidence of brain metastases. *Annals of Oncology*.:1846–1847.

Allen C, Dos Santos N, Gallagher R, Chiu GNC, Shu Y, Li WM, Johnstone SA, Janoff AS, Mayer LD, Webb MS, et al. 2002. Controlling the Physical Behavior and Biological Performance of Liposome Formulations through Use of Surface Grafted Poly(ethylene Glycol). *Bioscience Reports*. 22(2).

Amantea MA, Forrest A, Northfelt DW, Mamelok R. 1997. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegylated-liposomal doxorubicin in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*.:301–311.

André M do R, Amaral S, Mayer A, Miranda A, ROR-SUL Working Group. 2014. Sobrevida de Cancro da Mama e Factores Associados: Resultados do Registo Oncológico Regional Sul. *Acta Médica Portuguesa*. 27(3):325–330.

Assouline SE, Nielsen TH, Yu S, Alcaide M, Chong L, MacDonald D, et al. 2016. Phase 2 study of panobinostat with or without rituximab in relapsed diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*.:185–194.

Bacon NJ, Dernell WS, Ehrhart N, Powers BE, Withrow SJ. 2007. Evaluation of primary re-excision after recent inadequate resection of soft tissue sarcomas in dogs: 41 cases (1999–2004). *JAVMA*.

Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*.:499–506.

Barar J, Rafi MA, Pourseif MM, Omid Y. 2016. Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *BioImpacts*.:225–248.

Bastien JIL, McNeill KA, Fine HA. 2015. Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date. *Cancer*.:502–516.

- Baumert BG, Rutten I, Hing. Oberije C, et al. 2006. A pathology based substrate for target definition in radiosurgery of brain metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*:187–194.
- Begley DJ. 2004. ABC transporters and the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design.*:1295–1312.
- Bellocq NC, Pun SH, Jensen GS, Davis ME. 2003. Transferrin-Containing, Cyclodextrin Polymer-Based Particles for Tumor-Targeted Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry.*:1122–1132.
- Bergonié J, Tribondeau L. 2003. Classics of biology and medicine: Interpretation of Some Results from Radiotherapy and an Attempt to Determine a Rational Treatment Technique. *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE.*:181–182.
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Malecki A. 2008. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep.*:600–622.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery.*:769–784.
- Braun K, Ahluwalia MS. 2017. Treatment of Glioblastoma in Older Adults. *Current Oncology Reports.*
- Bremmes RM, Veve R, Hirsch FR, et al. 2002. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis and prognosis. *Lung Cancer.*:115–124.
- Brown PD, Davies SL, Speake T, Millar ID. 2004. Molecular mechanisms of cerebral fluid production. *Neuroscience.*:957–970.
- Bryne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. 2008. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews.*:1615–1627.
- Buchwald M, Krämer OH, Heinzel T. 2009. HDACi – Targets beyond chromatin. *Cancer Letters.*:160–167.
- Budhu S, Wolchok J, Merghoub T. 2014. The importance of animal models in tumor immunity and immunotherapy. *Current Opinion in Genetics & Development.*:46–51.
- Butowski NA. 2015. Epidemiology and diagnosis of brain tumors. *American Academy of Neurology.*
- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. 1990. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetised rats: a developmental study. *Journal of Physiology.*:47–62.
- Campling B, Baer K, Baker H, Lam Y-M, Cole S. 1993. Do glutathione and related enzymes play a role in drug resistance in small cell lung cancer cell lines? *British Journal of Cancer.*:327–335.
- Candolfi M, Curtin JF, Nichols S, Muhammad AKMG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF, et al. 2007. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal Of Neuro-Oncology.*
- Catley L. 2003. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood.*:2615–2622.
- CBTRUS. 2018. Statistical report: primary brain tumors in the United States, 2000-2004. Chicago: Central Brain Tumor Registry of the United States.
- Chang YS, Tomaso E, McDonald DM, et al. 2000. Mosaic blood vessel in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *PNAS USA.*:14608–14613.

- Chen Y-N, Mickley LA, Schwartz AM, Acton EM, Hwang JL, Fojo AT. 1990. Characterization of Adriamycin-resistant Human Breast Cancer Cells Which Display Overexpression of a Novel Resistance-related Membrane Protein. *Journal of Biological Chemistry*.:10073–10080.
- Chun P. 2015. Histone deacetylase inhibitors in hematological malignancies and solid tumors. *Archives of Pharmacal Research*.:933–949.
- Chun R, Garret LD, Vail DM. 2013. *Cancer Chemotherapy*. Em S. J. Withrow, D. M. Vail, R. L. Page, Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5ª. Missouri: Saunders Elsevier.
- Clark DE. 2003. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discovery Today*.:927–933.
- Clive S, Woo MM, Nydam T, Kelly L, Squier M, Kagan M. 2012. Characterizing the disposition, metabolism, and excretion of an orally active pan-deacetylase inhibitor, panobinostat, via trace radiolabeled ¹⁴C material in advanced cancer patients. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*.:513–522.
- Cooksey C. 2015. Quirks of dye nomenclature. 5. Rhodamines. *Biotechnic & Histochemistry*.:71–76.
- Cunha ESG. 2014. Avaliação dos efeitos secundários dos fármacos quimioterápicos em animais de companhia : estudo retrospectivo [Dissertação de Mestrado]. [Lisboa]: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Dallas S, Miller DS, Bendayan R. 2006. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacology Review*.:140–161.
- Davis FG, Dolecek TA, McCarthy BJ, Vilano JL. 2012. Toward determining the lifetime occurrence of metastatic brain tumors estimated from 2007 United States cancer incidence data. *Neuro Oncology*.:1171–7.
- DeAngelis LM, Posner JB. 2009. Intracranial metastases. In: LM De Angelis, JB Posner (Eds.), *Neurologic Complications of Cancer*. Oxford University Press, New York. :141–193.
- Dearth RK, Cui X, Kim H-J, Kuitse I, Lawrence NA, Zhang X, Lee AV. 2006. Mammary Tumorigenesis and Metastasis Caused by Overexpression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) or IRS-2. *Molecular and Cellular Biology*.:9302–9314.
- Deli MA, Abraham CS, Kataoka Y, Niwa M. 2005. Permeability studies on in vitro bloodbrain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiology*.:59–127.
- Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. 2013. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine*.:1509–1528.
- Dewey CW, Da Costa RC. 2016. *Practical guide to canine and feline neurology*. 3ª edição. JohnWiley & Sons, Inc.
- Diamandis EP, Christopoulos TK. 1991. The biotin-(strept)avidin system: Principles and applications in biotechnology. *Clinical Chemistry*.:625.
- Dias JNR, Aguiar SI, Pereira DM, André AS, Gano L, Correia JDG, Carrapiço B, Rütgen B, Malhó R, Peleteiro C, et al. 2018. The histone deacetylase inhibitor panobinostat is a potent antitumor agent in canine diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*.:28586–98.
- Dickinson PJ, Sturges BK, Higgins RJ, Roberts BN, Leutenegger CM, Bollen AW, et al. 2008. Vascular endothelial growth factor mRNA expression and peritumoral edema in canine primary central nervous system tumors. *Veterinary Pathology*.:131–139.

Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. 2007. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Molecular Cancer Research*.:981–9.

Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. 2013. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol*.(14).

Dorsey JF, Hollander AB, Alonso-Basanta M. 2014. Chapter 66: Cancer of the central nervous system In: Abelloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG, eds. *Abelloff's Clinical Oncology*. Elsevier. Philadelphia, Pa.

Eckford PD, Sharom FJ. 2009. ABC Efflux Pump-Based Resistance to Chemotherapy Drugs. *Chemical Reviews*. 109(7):2989–3011.

Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, et al. 2005. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*.:1407–27.

Eloy JO, Petrilli R, Trevizan LNF, Chorilli M. 2017. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.:454–467.

Ettinger SJ, Côté E, Feldman EJ. 2017. *Textbook of Veterinary Internal Medicine : diseases of the dog and the cat*. 8ª edição. Elsevier.

Eyüpoglu IY, Savaskan NE. 2016. Epigenetics in Brain Tumors: HDACs Take Center Stage. *Current Neuropharmacology*.:48–54.

Fadul C, Wood J, Thaler H, et al. 1988. Morbidity and mortality of craniotomy excision of supratentorial gliomas. *Neurology*.:1374–1379.

Farese JP, Withrow SJ. 2013. *Surgical Oncology*. Em S. J. Withrow, D. M. Vail & R. L. Page, Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5ª.

Farrington GK, Caram-Salas N, Haqqani AS, Brunette E, Eldredge J, Pepinsky B, Stanimirovic DB, et al. 2014. A novel platform for engineering blood-brain barrier-crossing bispecific biologics. *The FASEB Journal*.:4764–4778.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. 2013. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. International Agency for Research on Cancer. v1.0.

Fernandez AM, Torres-Alemán I. 2012. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews of Neuroscience*.:225.

Fink JR, Muzi M, Peck M, Krohn KA. 2015. Continuing Education: Multi-modality Brain Tumor Imaging – MRI, PET, and PET/MRI. *Journal of Nuclear Medicine*.:1–30.

Fiskus W, Rao R, Fernandez P. 2008. Molecular and biologic characterization and drug sensitivity of pan-histone deacetylase inhibitor-resistant acute myeloid leukemia cells. *Blood*.:2896–905.

Forsyth PA, Posner JB. 1993. Headaches in patients with brain tumors: a study of 111 patients. *Neurology*. 43:1678–1683.

Fredenhagen A, Kittelmann M, Oberer L, Kuhn A, Kuhnol J, Delemonte T, et al. 2012. Biocatalytic synthesis and structure elucidation of cyclized metabolites of the deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589). *Drug Metab Dispos*.:1041–50.

- Friedman HS, Prados MD, Wen LE, Cloughesy T. 2009. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal Clinical Oncology*.:4733–4740.
- Fukutomi A, Hatake K, Matsui K, Sakajiri S, Hirashima T, Tanii H, et al. 2012. A phase I study of oral panobinostat (LBH589) in Japanese patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*.:1096–106.
- Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. 2003. Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*.:419–436.
- Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, Lindmark T, Mabonzo A, et al. 2005. In vitro models for the blood-brain barrier. *Toxicology in vitro*.:299–334.
- Gardner HL, Fenger JM, London CA. 2016. Dog as a Model for Cancer. *Annual Review of Animal Bioscience*.:199–222.
- Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY. 1983. Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *Journal of Clinical Pathology*.:539–545.
- Gavrilovic IT, Posner JB. 2005. Brain metastases: epidemiology and pathophysiology. *Journal Of Neuro-Oncology*.:5–14.
- Gherzi-Egea J-F, Minn A, Siest G. 1988. A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier: activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. *Life Sciences*.:2515–2523.
- Gingrich MB, Traynelis SF. 2000. Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neuroscience*.:399–407.
- Gleeson MP. 2008. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *Journal of Medical Chemistry*.:817–834.
- Goldstein M, Kastan MB. 2015. The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy. *Annual Review of Medicine*.:129–143.
- Gray SG, Ekström TJ. 2001. The human histone deacetylase family. *Experimental Cell Research*.:75–83.
- Green EM. 2008. Radiotherapy: Basic principles and indications. Em J.D. Bonagura & R.W. Kirk, Kirk's current veterinary therapy. XIV. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders.
- Gumbleton M, Audus KL. 2001. Progress and limitations in the use of in vitro cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Science*.:1681–1698.
- Hall EJ, Wu C-S. 2003. Radiation-induced second cancers: The impact of 3D-CRT and IMRT. *Int J Radiation Oncology Biol Phys*.:83–88.
- Hansen AJ. 1985. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiology Review*.:101–148.
- Hayashi A, Horiuchi A, Kikuchi N, Hayashi T, Fuseya C, Suzuki A, Konishi I, Shiozawa T. 2010. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. *International Journal of Cancer*.:1332–1346.
- Housman G, Byler S, Heerboth S, Lapinska K, Longacre M, Snyder N, Sarkar S. 2014. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers*.:1769–1792.

Howlader N, et al. SEER cancer statistics review, 1975-2012. [accessed 2015 Nov 18]. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012.

Hsu E, Keene D, Ventureyra E, Matzinger MA, Jimenez C, Wang HS. 1998. Bone marrow metastasis in astrocytic gliomata. *J Neuro Oncol*.;285–293.

Hu C-MJ, Zhang L. 2009. Therapeutic nanoparticles to combat cancer drug resistance. *Current Drug Metabolism*.;836–841.

Hua S, Wu SY. 2013. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. *Frontiers in Pharmacology*.

IARC. 2018. GLOBOCAN 2018: Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2018, Portugal, both sexes, all ages. International Agency for Research on Cancer. [accessed 2019 Sep 20].

http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=620&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&age_s_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=.

Irfan Maqsood M, Matin MM, Bahrami AR, Ghasroldasht MM. 2013. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biology International*.;1038–1045.

Jacques K, Cormac O. 2013. Central nervous system tumors. *Handb Clin Neurol*.;931–958.

Jain RK, Stylianopoulos T. 2010. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology*.;653–664.

Jermyn K, Lascelles BDX. 2010. Principles of oncological surgery. Em J. M. Dobson & B. D. X. Lascelles, BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology. 3^a. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Jones AR, Shusta EV. 2007. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharmaceutical Research*.;1759–1771.

Kaal EC, Taphoorn MJ, Vecht CJ. 2005. Symptomatic management and imaging of brain metastases. *Journal Of Neuro-Oncology*.;15–20.

Kaplan M. 1964. Comparative approaches to chronic non-infectious diseases. In: C.W. Schwabe (ed.), *Veterinary Medicine and Human Health*, Ed. 1, Chap.9. Baltimore: Williams & Wilkins.

Khochbin S, Verdel A, Lemerrier C, Seigneurin-Berny D. 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Current Opinion in Genetics & Development*.;162–166.

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, et al. 2010. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med*.;116–122.

Kikuchi T, Daigo Y, Ishikawa N, et al. 2006. Expression profiles of metastatic brain tumor from lung adenocarcinomas on cDNA microarray. *Int J Oncol*.;799–805.

Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. 2010. Nanomedicine. *The New England Journal of Medicine*.

Kim MS, Kwan HJ, Lee YM, et al. 2001. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*.;437–443.

- King LJ, Anderson LR, Blackmore CG, Blackwell MJ, Lautner EA, Marcus LC, Mahr RK. 2008. Executive summary of the AVMA One Health Initiative Task Force report. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.:259–261.
- Kontermann R. 2012. Dual targeting strategies with bispecific antibodies. *mAbs*. 4(2):182–197.
- KuKanich B, Warner M, Hahn K. 2017. Analysis of lomustine drug content in FDA-approved and compounded lomustine capsules. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.:322–326.
- Kulkarni AD, Patel HM, Surana SJ, Belgamwar VS, Pardeshi CV. 2016. Brain–blood ratio: implications in brain drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*.:85–92.
- Kuo Y-C-, Chen Y-C. 2015. Targeting delivery of etoposide to inhibit the growth of human glioblastoma multiforme using lactoferrin- and folic acid-grafted poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*.:138–149.
- Lacy, J., Saadati, H., Yu, J. 2012. Complications of brain tumors and their treatment. *Hemat Oncol Clin North Am*.:779–796.
- Lai F, Fadda AM, Sinico C. 2013. Liposomes for brain delivery. *Expert Opin Drug Delivery*.:1003–1022.
- Lajoie JM, Shusta EV. 2015. Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.:613–631.
- LaRue SM, Gordon IK. 2013. Radiation Therapy. Em S. J. Withrow, D. M. Vail, R. L. Page, Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5^a. Missouri: Saunders Elsevier.
- Lebwohl D, Canetta R. 1998. Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: an Historical Perspective and an Update. *European Journal of Cancer*.:1522–1534.
- Lee EQ, Reardon DA, Schiff D, Drappatz J, Muzikansky A, Grimm SA, Wen PY, et al. 2015. Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma. *Neuro Oncology*.:862–867.
- Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, et al. 1982. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Annals of Internal Medicine*.:133–139.
- Li M, Shi K, Tang X, Wei J, Cun X, Chen X, He Q. 2018. pH-sensitive folic acid and dNP2 peptide dual-modified liposome for enhanced targeted chemotherapy of glioma. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Lila ASA, Ishida T. 2017. Liposomal Delivery Systems: Design Optimization and Current Applications. *Biol Pharm Bull*. 40(1).
- Lim DA, Huang YC, Alvarez-Buylla A. 2007. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurgery Clinics of North America*.:81–92.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*.:803–819.
- Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, Nessler RA, Wilson HK, Al-Ahmad A, Palecek SP, Shusta EV. 2012. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *National Biotechnology*.:783–791.

- Lipsitz D, Higgins RJ, Kortz GD, Dickinson PJ, Bollen AW, Naydan DK, et al. 2003. Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging and pathology in five dogs. *Veterinary Pathology*.:659–669.
- Liu DA, Tu M, Kelly RS, Chen C, Smith BJ. 2004. Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Durg Metab Dispos*.:132–139.
- Liu Y, Hui Y, Ran R, Yang G-Z, Wibowo D, Wang H-F, Zhao C-X. 2018. Synergetic Combinations of Dual-Targeting Ligands for Enhanced In Vitro and In Vivo Tumor Targeting. *Advanced Healthcare Materials*. 7(15)(1800106).
- Liu Y, Lu W. 2012. Recent advances in brain tumor-targeted nano-drug delivery systems. *Expert Opin Drug Delivery*.:671–686.
- Lopez AD, Mathers C, Ezzati M, et al. 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*.:1747–1757.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. 2007. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Loureiro JA, Gomes B, Fricker G, Cardoso I, Ribeiro CA, Gaiteiro C, Coelho MAN, Pereira MC, Rocha S. 2015. Dual ligand immunoliposomes for drug delivery to the brain. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.:213–219.
- Luan Y, Zuo L, Zhang S, Wang G, Peng T. 2015. MicroRNA-126 acts as a tumor suppressor in glioma cells by targeting insulin receptor substrate 1 (IRS-1). *Int J Clin Exp Pathol*.:10345–10354.
- Mangiola A, Anile C, Pompucci A, Capone G, Rigante L, De Bonis P. 2010. Glioblastoma therapy: going beyond Hercules Columns. *Expert Review of Neurotherapy*.:507–519.
- Marchetti D, Denkins Y, Reiland J, et al. 2003. Brainmetastatic melanoma: a neurotrophic perspective. *Pathol Oncol Res*.:147–158.
- Markman JL, Rekechenetskiy A, Holler E, Ljubimova JY. 2013. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Marks PA. 2010. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opinion on Investigational Drugs*.:1049–1066.
- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. 2000. Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*.:1210–1216.
- Matsumura Y, Hiroshi M. 1986. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research*.:6387–6392.
- Matz EL, Hsieh MH. 2017. Review of Advances in Uroprotective Agents for cyclophosphamide-and ifosfamide unduced hemorrhagic cystitis. *Urology*.:16–19.
- McEntee MC, Dewey CW. 2013. Tumors of the Nervous System. In S.J. Withrow, D.M. Vail, & R.L. Page, Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5th ed. Missouri: Saunders Elsevier.
- Minn A, Ghersi-Egea JF, Perrin R, et al. 1991. Drug metabolizing enzymes in the brain and cerebral microvessels. *Brain Res Rev*.:65–82.

Moore AS, Frimberger AE. 2008. Anticancer drugs and protocols: Traditional Drugs. Em J. D. Bonagura & R. W. Kirk, Kirk's current veterinary therapy. XIV. Philadelphia, Pa: Elsevier Saunders.

Morita R, Fujimoto A, Hatta N, et al. 1998. Comparison of genetic profiles between primary melanomas and their metastases reveals genetic alterations and clonal evolution during progression. *J Invest Dermatol.*:919–924.

Moritz CP. 2017. Tubulin or not tubulin: Heading towards total protein staining as loading control in Western blots. *PROTEOMICS.*:1600189.

Morris J, Dobson J. 2001. Treatment options. Em J. Morris & J. Dobson, Small Animal Oncology. Oxford: Blackwell Science.

Muggia FM. 1999. Doxorubicin-Polymer Conjugates: Further Demonstration of the Concept of Enhanced Permeability and Retention. *5(1)*:7–8.

Müller BM, Jana L, Kasajima A, Lehmann A, Prinzler J, Budczies J, Winzer KJ, Dietel M, Weichert W, Denkert C. 2013. Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer—Overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer.*:215.

Muruganandam A, Tanha J, Narang SA, Stanimirovic D. 2002. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmute across human blood–brain barrier endothelium. *FAS-EB Journal.*:240–242.

Muyldermans S. 2001. Single domain camel antibodies: current status. *Journal of Biotechnology.*:277–302.

Nag S, Begley DJ. 2005. Blood-brain barrier, exchange of metabolites and gases. In: Kalimo, H. (Ed.), Pathology and Genetics. Cerebrovascular Diseases. Neuropath. Press, Basel.

Nehoff H, Parayath NN, Domanovitch L, Taurin S, Greish K. 2014. Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *International Journal of Nanomedicine.*:2539–2555.

O'Brien SJ, Murphy WJ. 2003. Genomics. A dog's breakfast? *Science.*:1854–1855.

Omidi Y, Barar J. 2012. Impacts of Blood-Brain Barrier in Drug Delivery and Targeting of Brain Tumors. *BiolImpacts.*:5–22.

Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Barnholtz-Sloan JS. 2014. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology.*:896–913.

Pang LY, Argyle DJ. 2009. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1792:380–391.

Pang LY, Argyle DJ. 2016. Veterinary Oncology: Biology, big data and precision medicine. *The Veterinary Journal.*:38–45.

Paoloni M, Khanna C. 2008. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nature Reviews Cancer.*:147–156.

Papadia K, Markoutsas E, Antimisariar SG. 2014. A Simplified Method to Attach Antibodies on Liposomes by Biotin-Streptavidin Affinity for Rapid and Economical Screening of Targeted Liposomes. *Journal of Biomedical Nanotechnology.*:871–876.

- Pardridge WM. 1999. Blood-brain barrier biology and methodology. *Journal of Neurovirology*.:556–569.
- Pardridge WM. 2001. Crossing the blood-brain barrier: are we getting it right? *Drug Discovery Today*.:1–2.
- Pardridge WM. 2002a. Drug and gene Delivery to the Brain. *Neuron*.:555–558.
- Pardridge WM. 2002b. The lack of BBB research. *Drug Discovery Today*.:223–226.
- Pardridge WM. 2005. The blood–brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*.:3–14.
- Pardridge WM, Triguero D, Yang J, Cancilla PA. 1990. Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.:884–891.
- Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Moore D, et al. 2002. Anti-HER2 Immunoliposomes: Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery. *Clinical Cancer Research*.:1172–1181.
- Park SY, Jun JA, Jeong KJ, Heo HJ, Sohn JS, Lee HY, Park CG, Kang J. 2011. Histone deacetylases 1, 6 and 8 are critical for invasion in breast cancer. *Oncology Reports*.:1677–1681.
- Parker RJ, Eastman A, Bostick-Bruton F, Reed E. 1991. Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation. *Journal of Clinical Investigation*.:772–777.
- Paszko E, Senge MO. 2012. Immunoliposomes. *Current Medicinal Chemistry*.:5239–5277.
- Pérez-Larraya JG, Hildebrand J. 2014. Chapter 77: Brain Metases. *Neurologic Aspects of Systemic Disease Part.III*. Elsevier (Handbook of Clinical Neurology).
- Perkins A, Liu G. 2016. Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment.
- Peskin AV, Winterbourn CC. 2017. Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1. *Free Radical Biology and Medicine*.:188–191.
- Posner JB, Chernik NL. 1978. Intracranial metastases from systemic cancer. *Advances in Neurology*.:579–592.
- Preusser M, Capper D, Ilhan-Mutlu A, Berghoff AS, Birner P, Bartsch R, Marosi C, Zielinski C, Mehta MP, Winkler F, et al. 2012. Brain metastases: pathobiology and emerging targeted therapies. *Acta Neuropathologica*.:205–222.
- Prier JE, Brodey RS. 1963. Canine neoplasia: a prototype for human cancer study. *World Health Organization*.:331–344.
- Raghavendra NM, Pingili D, Kadasi S, Mettu A, Prasad SVUM. 2018. Dual or multi-targeting inhibitors: The next generation anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*.:1277–1300.
- Rao R, Nalluri S, Kolhe R, Yang Y, Fiskus W, Chen J, Ha K, Buckley KM, Balusu R, Coothankandaswamy V, et al. 2010. Treatment with panobinostat induces glucose-regulated protein 78 acetylation and endoplasmic reticulum stress in breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*.:942–52.
- Riaz MK, Riaz MA, Zhang X, Lin C, Wong K, Chen X, Yang Z. 2018. Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*.:1–27.

- Rico I. 2018. Desenvolvimento e otimização de lipossomas encapsulados com citotóxicos de elevada potência para imunoterapia [Dissertação de Mestrado]. [Lisboa]: Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária.
- Ringhieri P, Mannucci S, Conti G, Nicolato E, Fracasso G, Marzola P, Accardo A. 2017. liposomes derivatized with multimeric copies of KccYsl peptide as targeting agents for her-2overexpressing tumor cells. *International Journal of Nanomedicine*.:501–514.
- de Robles P. 2015. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oxford University Press on behalf of the Society for Neuro-Oncology*.:776–783.
- von Roemeling C, Jiang W, Chan CK, Weissman IL, Kim BY. 2017. Breaking down the barriers to precision cancer nanomedicine. *Trends of Biotechnology*.:159–171.
- Roy B, Guha P, Bhattarai R, Nahak P, Karmakar G, Chettri P, Panda AK. 2016. Influence of lipid composition, pH and temperature on physicochemical properties of lipossomes with curcumin as model drug. *Journal of Oleo Science*.:399–411.
- Rubin LL, Staddon JM. 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual Review of Neuroscience*.:11–28.
- Ryu S, Kim BI, Lim J-S, Tan CS, Chun BC. 2017. One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*.:411–414.
- Sadozai H, Saeidi D. 2013. Recent Developments in Liposome-Based Veterinary Therapeutics. *ISRN Veterinary Science*.:1–8.
- Sakuma J, Uzawa K, Onda T, Shiiba M, Yokoe H, Shibahara T, Tanzawa H. 2006. Aberrant expression of histone deacetylase 5 in oral squamous cell carcinoma. *Internal Journal of Oncology*.:117–124.
- San-Miguel JF, Hungria VTM, Yoon S-S, Elghandour A, Richardson PG, et al. 2014. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *The Lancet Oncology*.:1195–1206.
- Sauer I, Dunay IR, Weisgraber K, Bienert M, Dathe M. 2005. An apolipoprotein E-derived peptide mediates uptake of sterically stabilized lipossomes into brain capillary endothelial cells. *Biochemistry*.:2021–2029.
- Saveliera M, Woo MM, Schran H, Mu S, Nedelman J, Capdeville R. 2015. Population pharmacokinetics of intravenous and oral panobinostat in patients with hematologic and solid tumors. *European Journal of Clinical Pharmacology*.:663–72.
- Scheithauer W, Rosen H, Kornek GV, Sebesta C, Depisch D. 1975. Combination therapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine and imidazole carboxamide versus MOPP. *Cancer*.:752–755.
- Scherer HJ. 1940. The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain*, 63 (1).
- Schlachetzki F, Zhu C, Pardridge WM. 2002. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood–brain barrier. *Journal of Neurochemistry*.:203–206.
- Schouten LJ, Rutten J, Huveneers HA, et al. 2002. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, lung and melanoma. *Cancer*.:2698–2705.

Shanker-Sharma H, Sharma A. 2012. Neurotoxicity of engineered nano particles from metals. *CNS Neurol Disord Drug Targets*.:65–80.

Shi AA, Digumarthy SR, Temel JS, et al. 2006. Does initial staging or tumor histology better identify asymptomatic brain metastases in patients with non-small cell lung cancer? *Journal Thoracic Oncology*.:205–210.

Shilo M, Sharon A, Baranes K, Motiei M, Lellouche J-P-M, Popovtzer R. 2015. The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood–brain barrier: an in vitro endothelial cell model. *Journal of Nanobiotechnology*.:19.

Shmeeda H. 2006. Intracellular uptake and intracavitary targeting of folate-conjugated liposomes in a mouse lymphoma model with up-regulated folate receptors. *Molecular Cancer Therapeutics*.:818–824.

Silva M. 2019. Development of a new immunoliposome drug delivery system for treatment of pneumococcal meningitis. Tese de mestrado, Microbiologia Aplicada, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.

Singleton WG, Collins AM, Bienemann AS, Killick Cole CL, Haynes HR, Asby DJ, et al. 2017. Convection enhanced delivery of panobinostat (LBH589)-loaded pluronic nano-micelles prolongs survival in the F98 rat glioma model. *Internal Journal of Nanomedicine*.:1385–1399.

Slingerland M, Hess D, Clive S, Sharma S, Sandstrom P, Loman N, et al. 2014. A phase I, open-label, multicenter study to evaluate the pharmacokinetics and safety of oral panobinostat in patients with advanced solid tumors and various degrees of hepatic function. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*.:1089–98.

Soares M, Correia J, Carvalho S, Ferreira F. 2012. Avaliação da expressão de fHER2 em tumores mamários felinos e sua correlação com variáveis clinicopatológicas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*.(107(583-584)):191–198.

Solimando DA, Waddell JA. 2017. Procarbazine, Lomustine, and Vincristine (PCV) Regimen for Central Nervous System Tumors. *Hospital Pharmacy*.

Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, et al. 2005. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*.:264–268.

Souza CA, Simões R, Borges KBG, Oliveira AN, Zogeib JB, Alves B, Malachias MVB, Drummond-Lage AP, Rezende BA. 2018. Arterial Stiffness Use for Early Monitoring of Cardiovascular Adverse Events due to Anthracycline Chemotherapy in Breast Cancer Patients. A Pilot Study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*.:721–728.

Speth PAJ, van Hoesel QGCM, Haanen C. 1988. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics*.:15–31.

Steeg PS, Camphausen KA, Smith QR. 2011. Brain metastases as preventive and therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*.:352–363.

Stoica G, Kim HT, Hall D, Gand Coates JR. 2004. Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Veterinary Pathology*.:10–19.

Stupp R, Mason W, van den Bent M. 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*.:987–996.

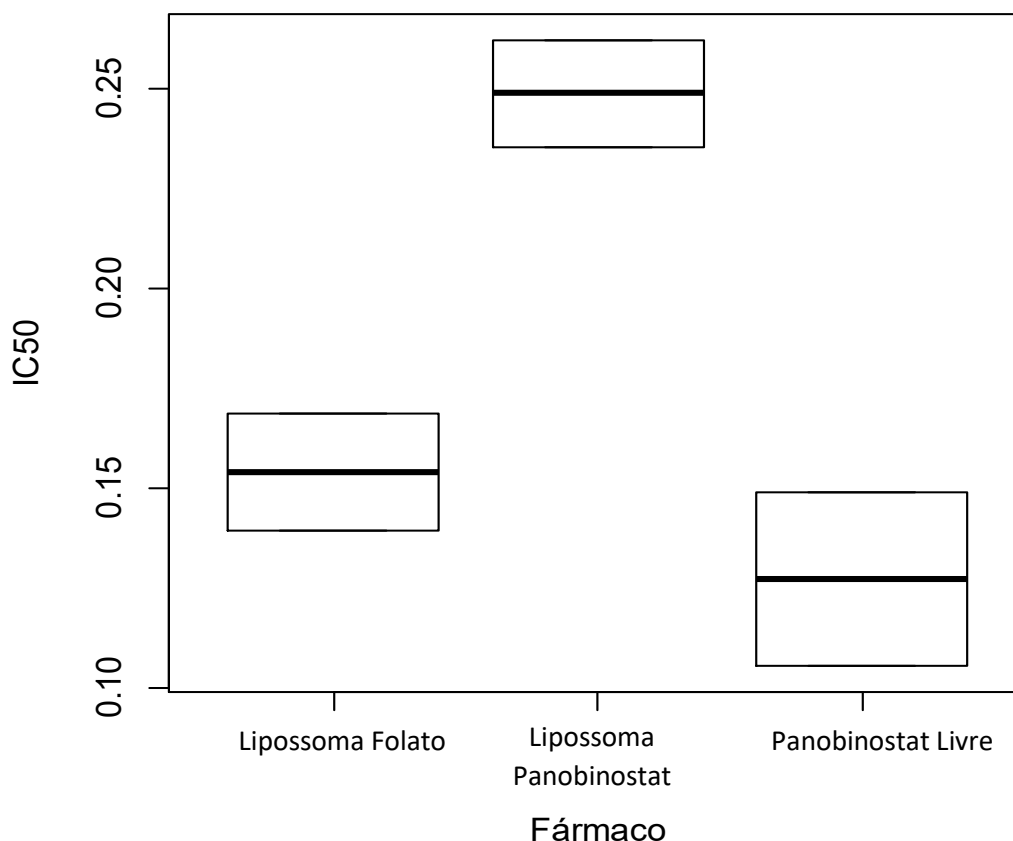
- Sturges BK, Dickinson PJ, Bollen AW, Koblik PD, Kass PH, Kortz GD, et al. 2008. Magnetic resonance imaging and histological classification of intracranial meningiomas in 112 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine/American College of Veterinary Internal Medicine*.:586–595.
- Sundberg JP, Schofield PN. 2009. One Medicine, One Pathology and One Health concept. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.:1530–1531.
- Surawicz TS, Davis F, Freels S, Laws Jr. ER, Menck HR. 1998. Brain tumor survival: Results from the National Cancer Data Base. *Journal Of Neuro-Oncology*.:151–160.
- Szebeni J, Fülöp T, Dézsi L, Metselaar B, Storm G. 2016. Liposomal doxorubicin: the good, the bad and the notso-ugly. *Journal of Drug Targeting*.:765–767.
- Taal W, Bromberg JEC, van den Bent MJ. 2015. Chemotherapy in glioma. *CNS Oncology*.:179–192.
- Takhar HS, Singhal N, Gowda R, Penniment M, Takhar P, Brown MP. 2015. Phase I study evaluating the safety and efficacy of oral panobinostat in combination with radiotherapy or chemoradiotherapy in patients with inoperable stage III non-small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs*.:1069–77.
- Tambe P, Kumar P, Paknikar KM, Gajbhiye V. 2018. Decapeptide functionalized targeted mesoporous silica nanoparticles with doxorubicin exhibit enhanced apoptotic effect in breast and prostate cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*.:7669–7680.
- Tan WW, Allred JB, Moreno-Aspitia A, Northfelt DW, Ingle JN, Goetz MP, et al. 2016. Phase I study of panobinostat (LBH589) and letrozole in postmenopausal metastatic breast cancer patients. *Clinical Breast Cancer*.:82–86.
- Tanha J, Dubuc G, Hiram T, Narang SA, MacKenzie CR. 2002. Selection by phage display of llama conventional VH fragments with heavy chain antibody VHH properties. *Journal of Immunology Methods*.:97–109.
- Tanha J, Muruganadam A, Stanimirovic D. 2003. Phage display technology for identifying specific antigens on brain endothelial cells. *Meth Mol Med*.
- Terasaki T, Ohtsuki S, Hori S, Takanaga H, Nakashima E, Hosoya K. 2003. New approaches to in vitro models of blood-brain barrier drug transport. *Drug Discovery Today*.:944–954.
- Thomas A, Tanaka M, Trepel J, Reinhold Y. 2017. Temozolomide in the Era of Precision Medicine. *Cancer Research*.:823–826.
- Thomson SA, Kennerly E, Olby N, Mickelson JR, Hoffmann DE, Dickinson PJ, et al. 2005. Microarray analysis of differentially expressed genes of primary tumors in the canine central nervous system. *Veterinary Pathology*.:550–558.
- Tilling T, Korte D, Hoheisel D, Galla HJ. 1998. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *Journal of Neurochemistry*.:1151–1157.
- Tollet MA, Duda L, Brown DC, Krick EL. 2015. Palliative radiation therapy for solid tumors in dogs: 103 cases (2007-2011). *Journal of the American Veterinary Medical Association*.:72–82.
- Torchilin VP. 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*.:145–160.
- Tortorella S, Karagiannis TC. 2014. Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis: A Useful Target for Cancer Therapy. *Journal Membrane Biology*.:291–307.

- Tran S, DeGiovanni P-J, Piel B, Rai P. 2017. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clinical and Translational Medicine*.
- Tsuji A, Tamai I. 1999. Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier. *Advances in Drug Delivery Review*.:277–290.
- Turrel JM, Fike JR, LeCouteur RA, Pflugfelder CM, Borcich JK. 1984. Radiotherapy of brain tumors in dogs. *Journal Am Vet Med Assoc*.:82–86.
- Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. 2009. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood–brain barrier (BBB). *European Journal of Pharm Biopharm*.:251–256.
- Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA. 2005. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*.:673–678.
- Vegge M, Westerman E, Hamberg P. 2017. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Panobinostat. *Clinical Pharmacokinetics*.:21–29.
- Walker JM, Kruger NJ. 2002. *The Protein Protocols Handbook* (2nd edition). Totowa, New Jersey : Humana Press.
- Wang AL, Tew KD. 1985. Increased glutathione-S-transferase activity in a cell line with acquired resistance to nitrogen mustards. *Cancer Treatment Reports*.:677–682.
- Wang C, Fu M, Mani S, et al. 2001. Histone acetylation and the cell cycle in cancer. *Front Bioscience*.:D610–D629.
- Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, Kataoka Y. 2013. Paracellular Barrier and Tight Junction Protein Expression in the Immortalized Brain Endothelial Cell Lines bEND.3, bEND.5 and Mouse Brain Endothelial Cell 4. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*.:492–495.
- Weller M, van den Bent M, Hopkins K, et al. 2014. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol*.:395–403.
- Wesseling P, von Deimling A, Aldape KD. 2007. Metastatic tumours of the CNS. In: DN Louis, H Ohgaki, OD Wiestler et al. (Eds.), *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. International Agency for Research on Cancer, Lyon.:248–251.
- WHO. 2007. *WHO 2007 Classification for diffuse gliomas*.
- Willuda J, Kubetzko S, Waibel R, Schubiger PA, Zangemeister-Wittke U, Plückthun A. 2001. Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185 (HER-2) miniantibodies multimerized by self-associating peptides. *Journal of Biological Chemistry*.:14385–14392.
- Withrow SJ. 2013. *Therapeutic Modalities for the Cancer Patient*. Em S. J. Withrow, D. M. Vail, R. L. Page, Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5^a. Missouri: Saunders Elsevier.
- Wolburg H. 2006. The endothelial frontier. In: Dermietzel, R., Spray, D.C., Nedergaard M (Eds.), *Blood-Brain Interfaces - from ontogeny to artificial barriers*. Wiley-VCH.
- Wolburg H, Lippoldt A. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology*.:323–337.

- Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.*:75–96.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental auto-immune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathologica.*:586–592.
- Wright SE, Rewers-Felkins KA, Quinlin IS, Phillips CA, Townsend M, Philip R, Sundaramurthy C. 2010. Number of Treatments cycles influences development of cytotoxic T cells in metastatic breast cancer patients - A phase I/II study. *Immunological Investigations.*:570–586.
- Xue Y, Wu J, Sun J. 2012. Four types of inorganic nanoparticles stimulate the inflammatory reaction in brain microglia and damage neurons in vitro. *Toxicology Letter.*:91–98.
- Ying X, Wen H, Lu WL, et al. 2010. Dual-targeting daunorubicin liposomes improve the therapeutic efficacy of brain glioma in animals. *Journal of Control Release.*:183–192.
- Zhang EY, Knipp GT, Ekins S, Swaan PW. 2002. Structural biology and function of solute transporters: implications for identifying and designing substrates. *Drug Metabolism Reviews.*:709–750.
- Zhang J, Pardridge WM. 2001. Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood–brain barrier. *Journal of Neuroimmunology.*:168–172.
- Zhang J, Tanha J, Hiramata T, Khieu NH, To R, Tong-Sevinc H, Stone E, Brisson JR, MacKenzie CR. 2004. Pentamerization of single-domain antibodies from phage libraries: a novel strategy for the rapid generation of high-avidity antibody reagents. *Journal of Molecular Biology.*:49–55.
- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Omoto Y, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hayashi S, Iwase H. 2004. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical Cancer Research.*:6962–6968.

ANEXO I – Gráficos e tabelas relativos à análise estatística para o ensaio de citotoxicidade de panobinostat na forma livre, panobinostat na forma lipossomal e panobinostat na forma lipossomal com PEG-folato em U87.

Diagrama caixa-de-bigodes para representação da distribuição dos valores de IC50 relativos a panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG-folato, panobinostat encapsulado em lipossoma e panobinostat livre.



Análise da variância do IC50 dos fármacos aplicados no ensaio de citotoxicidade - panobinostat encapsulado em lipossomas com PEG-folato, panobinostat encapsulado em lipossomas com PEG e panobinostat livre.

	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Valor de F	Nível de Significância
Fármacos	2	0,0163	0,0081	14,12	0,0298*
Resíduos	3	0,0017	0,0005	-	-

Códigos de significância:

0-***; 0,001- **, 0,01-*, 0,05- .

Teste de Turkey para identificação das médias que diferem entre si.

	Estimativa	Erro Padrão	Valor t	Pr (> t)
Panobinostat – Pan. Lip.	-0,1216	0,0240	-5,057	0,030*
Panobinostat – Pan.Lip. Fol.	-0,0268	0,0240	-1,114	0,569
Pan Lip. – Pan. Lip. Fol.	0,0948	0,0240	3,943	0,058.

Códigos de significância:

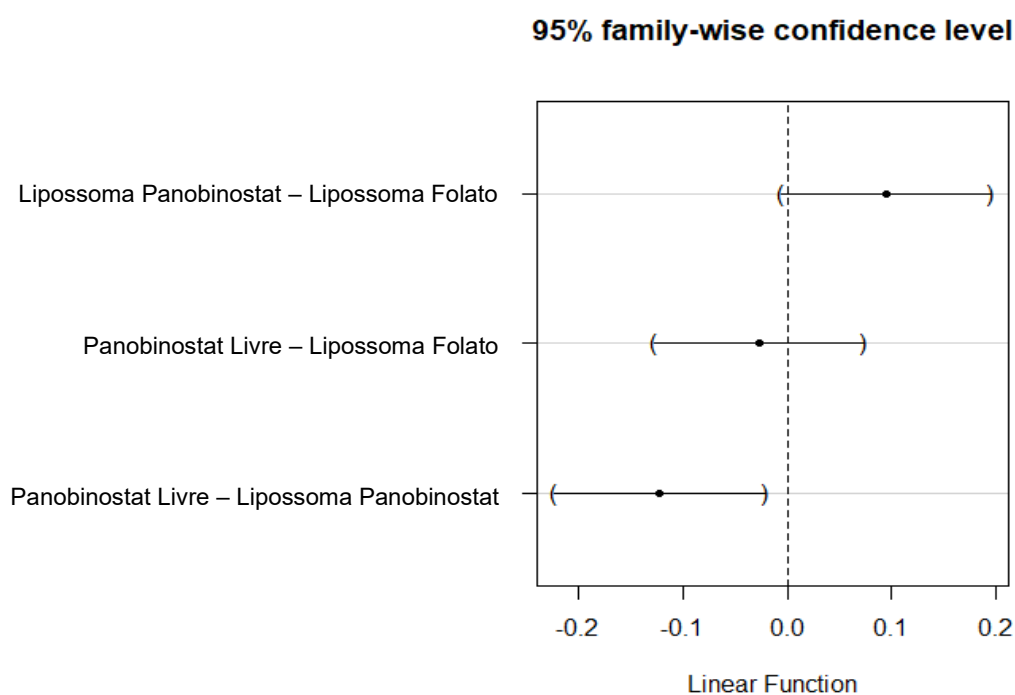
0-***; 0,001- **; 0,01-*; 0,05- .

Intervalos de confiança do teste de Turkey para comparação de múltiplas médias.

	Estimativa	Inferior 1	Superior 1
Panobinostat – Pan. Lip.	-0,1216	-0,0222	-0,0208
Panobinostat – Pan.Lip. Fol.	-0,0268	-0,1275	0,0739
Pan Lip. – Pan. Lip. Fol.	0,0948	-0,0059	0,1956

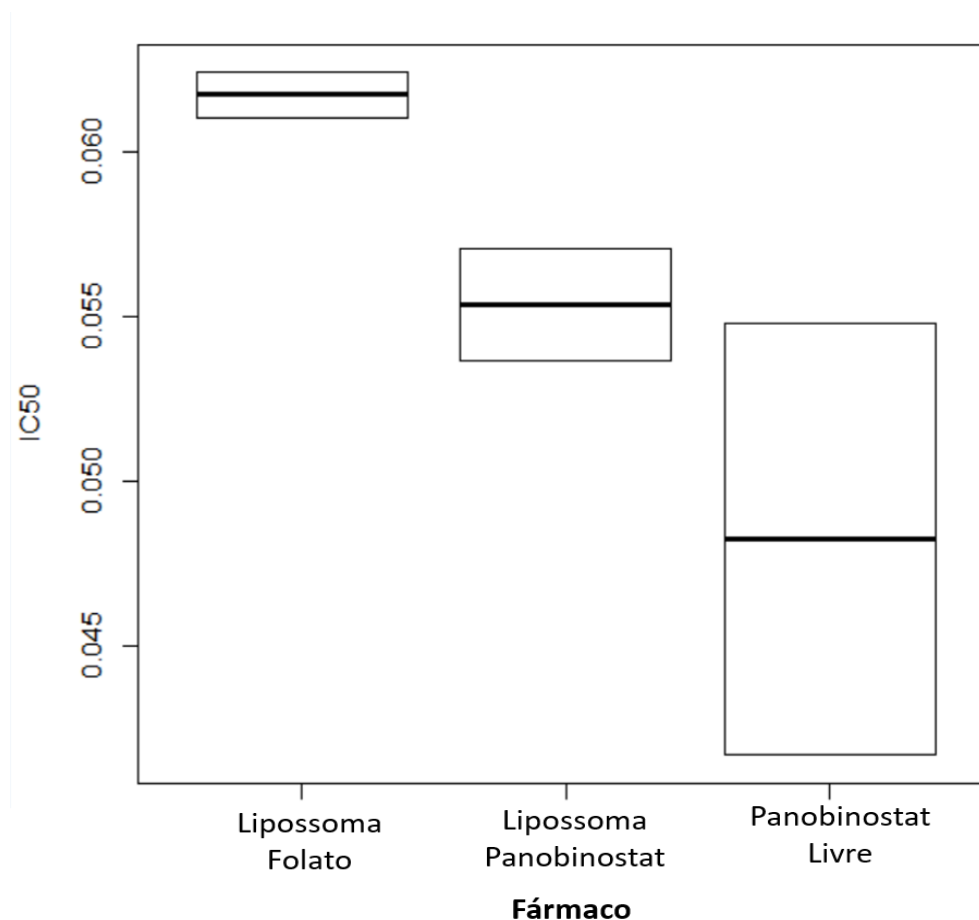
1- Valores dos limites superior e inferior calculados relativamente ao desvio padrão

Gráfico do nível de confiança para cada associação de fármacos no teste Tukey



ANEXO II – Gráficos e tabelas relativos à análise estatística para o ensaio de citotoxicidade de panobinostat na forma livre, panobinostat na forma lipossomal e panobinostat na forma lipossomal com PEG-folato em MCF7.

Diagrama caixa-de-bigodes para representação da distribuição dos valores de IC50 relativos a panobinostat encapsulado em lipossoma com PEG-folato, panobinostat encapsulado em lipossoma e panobinostat livre.



Análise da variância do IC50 dos fármacos aplicados no ensaio de citotoxicidade - panobinostat encapsulado em lipossomas com PEG-folato, panobinostat encapsulado em lipossomas com PEG e panobinostat livre.

	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	Valor de F	Nível de Significância
Fármacos	2	0,00018	0,00009	2,94	0,196
Resíduos	3	0,00009	0,00003	-	-

Códigos de significância:

0-***, 0,001- **, 0,01-*, 0,05- .

Teste de Turkey para identificação das médias que diferem entre si.

	Estimativa	Erro Padrão	Valor t	Pr (> t)
Panobinostat – Pan. Lip.	-0,0071	0,0056	-1,2810	0,4940
Panobinostat – Pan.Lip. Fol.	-0,0135	0,0056	-2,4230	0,1790
Pan Lip. – Pan. Lip. Fol.	-0,0064	0,0056	-1,1420	0,5560

Códigos de significância:

0-***; 0,001- **; 0,01-*; 0,05- .

Intervalos de confiança do teste de Turkey para comparação de múltiplas médias.

	Estimativa	Inferior 1	Superior 1
Panobinostat – Pan. Lip.	-0,0071	-0,0304	0,0161
Panobinostat – Pan.Lip. Fol.	-0,0135	-0,0367	0,0098
Pan Lip. – Pan. Lip. Fol.	-0,0063	-0,0296	0,0169

Gráfico do nível de confiança para cada associação de fármacos no teste Tukey

